



# Structure et mécanisme d'élaboration de biomatériaux par complexation contrôlée de polysaccharides

Marie Costalat

## ► To cite this version:

Marie Costalat. Structure et mécanisme d'élaboration de biomatériaux par complexation contrôlée de polysaccharides. Matériaux. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10265 . tel-01128266

**HAL Id: tel-01128266**

**<https://theses.hal.science/tel-01128266>**

Submitted on 9 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 265 - 2014

Année 2014

# THESE

Présentée

Devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

Pour l'obtention

Du DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité « **Matériaux Innovants** »

Soutenue publiquement le 3 décembre 2014

Par

Marie COSTALAT

## Structure et mécanisme d'élaboration de biomatériaux par complexation contrôlée de polysaccharides

Directeur de thèse :

M Thierry DELAIR

Co-directeur :

M Laurent DAVID

Jury :

M Jean-François BERRET

Rapporteur

M Philippe CASSAGNAU

Examineur

M Didier LE CERF

Rapporteur

M Christophe SCHATZ

Examineur



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



---

**RESUME en français :**

Nos travaux ont porté sur le développement d'une méthode contrôlée de complexation de polyélectrolytes. La complexation est un processus spontané, sous contrôle cinétique et irréversible dans le cas de polysaccharides tels que le chitosane et les polysulfates, essentiellement le sulfate de dextrane ou l'héparine. Une conséquence de ce contrôle cinétique est que l'obtention d'objets de taille colloïdale requiert de travailler à fortes dilutions. De plus, les nanovecteurs obtenus ne sont pas toujours compatibles avec des conditions d'utilisation dans des milieux physiologiques. Le contrôle de l'association de polysaccharides se fait par écrantage des interactions électrostatiques attractives en présence de chlorure de sodium à la concentration au moins égale à 2 mol.L<sup>-1</sup>. L'élimination du sel par dialyse induit la formation d'hydrogels dont les caractéristiques et les propriétés dépendent principalement du rapport de charges n<sup>+</sup>/n<sup>-</sup> et de la cinétique d'élimination du sel. Ainsi, l'on peut former des hydrogels massifs ou des systèmes dispersés à des concentrations en polymères jusqu'à 30 fois plus élevées que par les méthodes sous contrôle cinétique. De plus, cette technologie permet l'encapsulation des principes actifs dans les particules qui peuvent aussi être fonctionnalisées par des biomolécules d'adressage.

Le résultat majeur de ce travail réside en la maîtrise des associations entre polysaccharides de charges opposées, permettant d'obtenir des systèmes colloïdaux et massifs à fort potentiels d'applications biomédicales.

---

**TITRE en anglais:**

Structure and elaboration mechanism of biomaterials by controlled complexation of polysaccharides

---

**RESUME en anglais:**

Our work dealt with the development of a controlled method of polyelectrolyte complexation. The complexation is a spontaneous process, under kinetic control and irreversible in the case of polysaccharides such as the chitosan and polysulfates, essentially dextran sulfate or heparin. A consequence of this kinetic control is the requirement to work at high dilution to obtain objects of colloidal size. Moreover, the obtained nanovectors were not always adapted for use in physiological media. The control of the association of polysaccharides was achieved by screening the attractive electrostatic interactions in the presence of sodium chloride at concentration at least equal to 2 mol. L<sup>-1</sup>. Removal of salt by dialysis resulted in the formation of hydrogels, whose characteristics and properties depended mainly on the charge ratio n<sup>+</sup>/n<sup>-</sup> and the kinetics of the salt elimination. Thus, massive or dispersed hydrogels were formed at polymer concentrations up to 30 times higher than by the methods under kinetic control. Furthermore, this technology allowed the encapsulation of active ingredients in the particles that could also be functionalized with biomolecules for targeting. The major result of this work was the control over the associations between oppositely charged polysaccharides which provided colloidal and massive systems of high potentialities in biomedical applications.



## REMERCIEMENT

Ma thèse s'est déroulée au Laboratoire IMP@LYON 1. Je tiens à remercier Philippe Cassagnau, directeur du laboratoire pour m'avoir donné les moyens d'effectuer mes travaux.

Je voudrais exprimer ma gratitude à tous les membres de mon jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail : Messieurs Didier Le Cerf et Jean-François Berret, respectivement professeur à l'Université de Rouen et directeur de recherche CNRS, Université Paris VII pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse et pour leur relecture; Monsieur Philippe Cassagnau, professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1 pour avoir accepté d'être le président du jury et Monsieur Christophe Schatz, maître de conférence à l'Institut Polytechnique de Bordeaux pour sa participation en tant qu'examineur.

Concernant la thèse proprement dite, mes remerciements les plus chaleureux vont à mon directeur de thèse Thierry Delair. Il a toujours été disponible, à l'écoute, et s'est toujours intéressé à l'avancée de mes travaux. Ses conseils sont pour beaucoup dans le résultat final de ce travail. Sa capacité d'analyse et son enthousiasme a été un vecteur de motivation. Enfin, sa grande patience notamment au moment de la rédaction, ses nombreuses relectures et corrections de cette thèse ont été très appréciables. Cette thèse lui doit beaucoup. Pour tout cela, je tiens à lui témoigner toute ma gratitude.

Laurent David a aussi beaucoup contribué à cette aventure en tant que co-directeur de thèse. Je lui remercie chaleureusement pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux. Sans lui, il aurait été difficile et même impossible pour moi de comprendre les données SAXS.

Pour mener à bien ce travail de recherche, j'ai dû côtoyer un certain nombre de personnes et leur contact fut particulièrement enrichissant. Je tiens donc à remercier comme il se doit les personnes suivantes : Bernard Verrier pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire pour mes expérimentations bio; Céline Terrat pour son expertise en ELISA ; Pierre Alcouffe pour les analyses microscopiques et Agnès Crépet pour m'avoir aidée dans la caractérisation du chitosane. Il m'est impossible d'oublier Jean-Michel Lucas pour son aide précieuse toujours dans le domaine de la caractérisation des polysaccharides et surtout pour sa sympathie.



La thèse est aussi des rencontres qui, en ce qui me concerne, se sont mues en amitié profonde. J'embrasse ainsi Danjun, Jihane et Ramona. Merci à vous !

J'ai aussi une pensée amicale aux personnes qui ont fait que chaque journée soit ensoleillée, même si il pleut : Sylvie, Flavien, Thierry, Alice, Jingping, Marwa. Mais également Sabine, Célia, Marine. Merci les filles. Je vous attends pour d'autres journées spa.

Ce manuscrit est dédié à ma famille. Merci à mes parents pour leur soutien indéfectible et leur amour inconditionnel. À mes sœurs, Eliana et Suza pour leurs encouragements à toute épreuve. À Johan et Mailys, de vrais rayons de soleil surtout dans les moments les plus difficiles. À Bertrand et Morgan. Je vous aime tous !

*A mes parents,  
à Johan et Mailys,  
avec toute mon affection*



*Comprendre est le commencement d'approuver*

Baruch Spinoza



# Préface

Comment délivrer un médicament à une zone ciblée de l'organisme sans qu'il perde en efficacité et sans induire une quelconque toxicité? Cette question fondamentale se pose depuis longtemps, notamment pour les traitements chimiothérapiques de longue durée contre des pathologies telles que les cancers ou les maladies infectieuses chroniques. Les liposomes, découverts par Bangham en 1965, ont été une première réponse à cette problématique. Cependant, l'administration orale de tels systèmes reste encore aujourd'hui un défi compte tenu des difficultés liées à la biopharmaceutique (exigences physico-chimiques des médicaments et le système de livraison) et aux conditions physiologiques rencontrées dans le milieu gastro-intestinal.

Le projet ANR PECSDDeli (**P**rocessable intellig**E**nt **C**olloids for muco**S**al **D**rug **D**elivery), à l'origine de ce présent travail vise à développer des systèmes nanométriques pour la délivrance de principes actifs, en particulier des molécules antirétrovirales dans les réservoirs naturels du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les patients infectés par le VIH, sous traitement par trithérapies, présentent une faible concentration sanguine de virus circulant (charge virale). Cependant, dès l'arrêt du traitement, ou suite à une mutation du virus conduisant à une souche résistante au traitement, la charge virale remonte rapidement. Cela est un phénomène bien connu qui provient du fait que le virus reste stocké dans les cellules T sous-épithéliales de l'intestin, qui constituent ainsi des réservoirs à virus. L'objectif ultime du projet ANR est donc de mettre au point des systèmes de délivrance d'antirétroviraux dans ces cellules pour éliminer ces réservoirs naturels. Ces derniers expriment à leur surface le récepteur de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  qui constituera donc le mode de ciblage privilégié dans ce travail

Le consortium PECSDDeli, coordonné par le professeur Thierry DELAIR, inclus cinq partenaires aux tâches bien définies : (i) le laboratoire GIMAP<sup>1</sup> et CEA<sup>2</sup> pour respectivement

---

<sup>1</sup> Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, est un laboratoire de l'université Jean Monnet Saint Etienne dont les thématiques de recherche gravitent autour de la physiopathologie et de la prévention de l'infection par voie muqueuse.

<sup>2</sup> Service d'immuno-virologie, unité mixte CEA/Paris XI : [www-dsv.cea.fr](http://www-dsv.cea.fr)

les tests *in vitro* et *in vivo* des nanosystèmes, (ii) la société B Cell Design<sup>3</sup>, pour la production des ligands de types IgAs nécessaires au ciblage. (iii) l'IBCP<sup>4</sup> pour la formulation de nanovecteurs à base d'acide polylactique. (iv) et enfin l'IMP<sup>5</sup>, pour la formulation de nanovecteurs à partir d'association du chitosane avec un polyélectrolyte de charge opposée. Dans ce contexte, le travail présenté dans ce manuscrit, se concentrera sur le développement d'une méthode d'élaboration de nanovecteurs à anti-rétrovirus ciblant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , utilisant des polymères naturels, présentant une sécurité maximale pour les patients et suffisamment facile de mise en œuvre pour avoir un réel potentiel d'industrialisation.

---

<sup>3</sup> [www.b-cell-design.com](http://www.b-cell-design.com)

<sup>4</sup> Institut de Biologie et Chimie des Protéines : [www.ibcp.fr](http://www.ibcp.fr)

<sup>5</sup> Ingénierie des Matériaux Polymères (site IMP@LYON1): [www.imp.cnrs.fr](http://www.imp.cnrs.fr)

# Table des matières

---





<b>PREFACE .....</b>	<b>13</b>
----------------------	-----------

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>23</b>
------------------------------------	-----------

## **PREMIERE PARTIE.**

### **LES COMPLEXES POLYELECTROLYTES : DE LA SOLUTION A LA FORMATION DE MATERIAUX**

<b>STRUCTURES .....</b>	<b>29</b>
-------------------------	-----------

<b>I. STRUCTURE ET DYNAMIQUE DES POLYELECTROLYTES EN SOLUTION .....</b>	<b>31</b>
---	-----------

1. ORGANISATION DES POLYMERES NEUTRES EN SOLUTION .....	31
---	----

2. LES CHAINES POLYELECTROLYTES EN SOLUTION .....	33
---	----

2.1 Portée des interactions électrostatiques .....	34
--	----

2.2 Conformation des polyélectrolytes en solution .....	36
---	----

2.2.1 Influence de la densité de charge.....	36
--	----

2.2.1.1 Chaîne faiblement chargée .....	36
---	----

2.2.1.2 Chaîne fortement chargée .....	37
--	----

2.2.2 Influence de la concentration en polymère .....	38
---	----

2.2.2.1 Régime dilué.....	38
---------------------------	----

2.2.2.2 Régime semi-dilué.....	38
--------------------------------	----

2.2.3 Influence d'un électrolyte .....	39
--	----

3. TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES POLYELECTROLYTES.....	40
--	----

3.1 Viscosimétrie capillaire.....	40
-----------------------------------	----

3.1.1 Cas des polymères neutres .....	41
---------------------------------------	----

3.1.2 Cas des polyélectrolytes .....	43
--------------------------------------	----

3.2 Diffusion des rayons X aux petits angles .....	45
--	----

CONCLUSION.....	48
-----------------	----

<b>II. LES POLYELECTROLYTES A BASE DE POLYSACCHARIDES .....</b>	<b>48</b>
---	-----------

1. LE CHITOSANE.....	49
----------------------	----

1.1 Définition, origine et structure.....	49
---	----

1.2 Comportement en solution .....	51
------------------------------------	----

1.2.1 Solubilité.....	51
-----------------------	----

1.2.2 Conformation en solution .....	52
--------------------------------------	----

1.3 Préparation d'une série homogène d'échantillons de chitosane .....	55
--	----

1.3.1 N-acétylation .....	56
---------------------------	----

1.3.2 Dépolymérisation .....	56
2. LE SULFATE DE DEXTRANE .....	56
2.1 Définition, origine et structure.....	56
2.2 Conformation en solution .....	57
3. L'HEPARINE .....	58
3.1 Définition, origine et structure.....	58
3.2 Conformation en solution .....	60
CONCLUSION.....	60
<b>III. LES COMPLEXES POLYELECTROLYTES A BASE DE POLYSACCHARIDES.....</b>	<b>61</b>
1. MECANISME D'ASSEMBLAGE DES COMPLEXES POLYELECTROLYTES .....	61
2. LES COMPLEXES POLYELECTROLYTES SOLUBLES DANS L'EAU .....	64
3. LES COMPLEXES POLYELECTROLYTES COLLOÏDAUX .....	65
3.1 Effets des paramètres intrinsèques des polyélectrolytes .....	66
3.2 Effets des conditions expérimentales .....	68
3.3 Stabilité des complexes colloïdaux.....	70
3.4 Applications biomédicales des complexes colloïdaux.....	71
4. LES COMPLEXES POLYELECTROLYTES HYDROGELS .....	74
4.1 Structure et formation des complexes hydrogels .....	74
4.2 Applications des complexes hydrogels.....	75
CONCLUSION.....	75
<b>CONCLUSION PREMIERE PARTIE .....</b>	<b>76</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u></b>	<b><u>77</u></b>

## **DEUXIEME PARTIE.**

<b><u>LES COMPLEXES COLLOÏDAUX MULTIFONCTIONNELS A BASE DE POLYSACCHARIDES.....</u></b>	<b><u>99</u></b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>101</b>
<b>II. ELABORATION DE COLLOÏDES PAR ASSOCIATION CONTROLEE DE BIOPOLYMERES.....</b>	<b>103</b>
1. PREPARATION D'ECHANTILLONS DE CHITOSANE A STRUCTURE MACROMOLECULAIRE CONTROLEE .....	104
2. PUBLICATION 1: " REVERSIBLE CONTROLLED ASSEMBLY OF CHITOSAN AND DEXTRAN SULFATE: A NEW METHOD FOR NANOPARTICLE ELABORATION" .....	105
3. BILAN.....	136
<b>III. APPLICATION COMME VECTEURS DE MOLECULES BIOLOGIQUES.....</b>	<b>137</b>
1. PUBLICATION 2: « CONTROLLING THE COMPLEXATION OF POLYSACCHARIDES INTO MULTI-FUNCTIONAL COLLOIDAL ASSEMBLIES FOR NANOMEDICINE » .....	137

2. BILAN.....	169
CONCLUSION DEUXIEME PARTIE .....	170
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>171</u>

### TROISIEME PARTIE.

<u>LES COMPLEXES HYDROGELS A BASE DE POLYSACCHARIDES.....</u>	<u>177</u>
I. INTRODUCTION .....	179
II. PUBLICATION 3: « MACRO-HYDROGEL VERSUS NANOPARTICLE FORMATION BY THE CONTROLLED POLYELECTROLYTE COMPLEXATION OF POLYSACCHARIDES» .....	180
III. BILAN .....	201
CONCLUSION TROISIEME PARTIE .....	202
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>203</u>

<u>CONCLUSION GENERALE.....</u>	<u>207</u>
---------------------------------	------------

<u>ANNEXES. TECHNIQUES EXPERIMENTALES .....</u>	<u>213</u>
I. DETERMINATION DU DEGRE D'ACETYLATION DU CHITOSANE .....	215
II. DETERMINATION DES TAUX DE SULFATE DU SULFATE DE DEXTRANE ET DE L'HEPARINE .....	217
III. DETERMINATION DE LA MASSE MOLEAIRE ET INDICE DE POLYDISPERSITE DES POLYSACCHARIDES .....	219
IV. LA DIALYSE .....	221
V. DETERMINATION DE LA TAILLE DES PARTICULES.....	223
VI. POTENTIEL ZETA .....	225
VII. DIFFUSION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES APPLIQUEE AUX COMPLEXES POLYELECTROLYTES .....	227
VIII. PREPARATION DE L'ADENOSINE MONOPHOSPHATE (AMP) .....	231
IX. DETERMINATION DE LA QUANTITE D'AMP ENCAPSULE.....	233
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>235</u>

<u>VALORISATION DU PROJET PECSDDDELI .....</u>	<u>239</u>
--	------------



# Liste des abréviations

AMP	Adénosine 5'-monophosphate
$b$	Distance moyenne entre deux charges voisines dans une chaîne polyélectrolyte
$C^*$	Concentration critique d'enchevêtrement des chaînes polymères
$C_c$	Critical salt concentration (concentration critique en sel)
CDS	Complex dissociating salt (sel induisant la dissociation des complexes)
$C_i$	Concentration en espèce ionique $i$
$C_p$	Concentration en polymère
CS	Chitosane
DA	Degré d'acétylation
DS	Sulfate de dextrane
$e$	Charge électrique élémentaire
$\varepsilon$	Constante diélectrique
$[\eta]$	Viscosité intrinsèque
HP	Héparine
$I$	Force ionique
$\kappa^{-1}$	Longueur d'écran de Debye-Hückel
$k_B$	Constante de Boltzman
$\lambda$	Longueur d'onde
$l_B$	Longueur de Bjerrum
$L_p$	Longueur de persistance totale
$L_{pe}$	Longueur de persistance électrostatique
$L_{pi}$	Longueur de persistance intrinsèque
$M$	Masse molaire ( $\text{g.mol}^{-1}$ )
$N_A$	Nombre d'Avogadro
PSC	Particle solid content (concentration en particules)
$r$	Distance séparant deux charges élémentaires
$R$	Distance entre les extrémités de chaînes polymères
$R_G$	Rayon de giration
$R(n+/n-)$	Rapport de charge polycation/polyanion
SSS	Salt screening concentration (Concentration en sel d'écrantage)
$T$	Température
$\xi$	Longueur de corrélation
$\xi_e$	Taille d'un blob électrostatique
$\xi_M$	Paramètre de Manning
$z_i$	Charge d'une espèce ionique $i$



# Introduction générale

---





Les avancées technologiques de ces dernières années en matière de nanotechnologie ont conduit au développement d'une nouvelle génération de médicaments capables d'exercer une action thérapeutique au sein même d'un organe, tissu ou cellule malade. Formulés selon le concept de la vectorisation, le défi de ces nano-objets est de (i) protéger la molécule active contre les phénomènes de dégradation, (ii) contrôler le taux de principe actif libéré dans le but de réduire les effets toxiques ou le nombre de prises notamment lors d'un traitement s'inscrivant dans le temps, (iii) maintenir la durée de l'activité thérapeutique et/ou de ciblage ou encore (iv) activer le système immunitaire. La conception de tels systèmes nécessite une stratégie bien élaborée qui requiert la maîtrise de la synthèse, et la caractérisation physicochimique et pharmacologique d'objets de tailles submicroniques. Elle doit, par ailleurs, obéir aux contraintes réglementaires imposées par les autorités compétentes pour le développement de tous produits pharmaceutiques destinés à l'homme. Ces vecteurs doivent donc nécessairement être conçus avec des matériaux biocompatibles, biorésorbables et non toxiques et par un procédé d'élaboration compatible avec le contexte réglementaire.

Ce travail s'articule autour de la conception de colloïdes thérapeutiques. Parmi les nombreuses voies de synthèse, on peut citer la complexation de polyélectrolyte à base de polysaccharides. Simple à mettre en œuvre, elle consiste uniquement à mélanger deux solutions de polyélectrolytes de charges opposées. De plus, elle se déroule uniquement dans l'eau ce qui évite l'utilisation de solvants organiques ou de tensioactifs potentiellement toxiques. La neutralisation spontanée des charges des deux polymères conduit à la formation de particules de tailles colloïdales. Ceci requiert cependant des conditions très diluées ce qui aboutit à l'obtention de faible taux de solides rendant difficile toute étape de concentration notamment pour une application importante.

L'objectif général de cette thèse est de développer une nouvelle méthode basée sur la complexation de polyélectrolytes adaptée à l'utilisation de forte concentration en polymère. Elle repose sur le contrôle de la neutralisation des polyélectrolytes par la modulation des interactions électrostatiques qui régissent leur association. Cette technique devrait conduire à la formation de colloïdes biocompatibles, avec une taille maîtrisée, reproductible et inférieure au micromètre en raison des applications visées. Par ailleurs, les colloïdes formés devraient être stables en milieu physiologique et avoir une interface modulable (de charges positives ou

négligentes) capable de fixer des protéines pour le ciblage thérapeutique. Pour cette étude, nous avons choisi le chitosane, un polysaccharide naturel biocompatible comme polycation et le sulfate de dextrane et l'héparine comme polyanions.

Le présent manuscrit est organisé en trois parties :

La première partie introduit les principales théories concernant la structure et la conformation des polyélectrolytes en solution. Les effets des facteurs tels que la force ionique, la densité de charge et la concentration seront discutés. Ce chapitre décrit également les trois polysaccharides étudiés en mettant l'accent sur leur conformation en solution puisque celle-ci conditionne la réaction de complexation. Le dernier paragraphe est consacré à l'état de l'art sur l'élaboration de complexe à partir de biopolymères et les propriétés des biomatériaux formés.

L'originalité de notre étude réside dans le contrôle de l'association des deux polysaccharides par l'ajout d'un électrolyte d'écrantage, le chlorure de sodium. Pour que la réaction de complexation puisse se faire, il est primordial de maintenir la solvation des polysaccharides en présence de sel. La mise en place de la méthode requiert donc une bonne compréhension de l'effet du chlorure de sodium sur la solvation du chitosane et du sulfate de dextrane et des effets de l'écrantage sur la nature des objets formés. Ces aspects seront décrits dans la deuxième partie du manuscrit.

Notre stratégie d'élaboration de colloïdes a par ailleurs conduit, sous certaines conditions, à la formation d'un macrohydrogel. Face à cette perspective, la troisième partie montrera l'intérêt de la maîtrise de la concentration en NaCl d'écrantage, du ratio de charge  $n^+/n^-$ , et de la masse molaire du polycation sur la nature de l'objet formé : dispersion de particules ou macrohydrogel.

Les résultats expérimentaux décrits dans les parties 2 et 3 s'articuleront autour des publications suivantes :

- Reversible controlled assembly of chitosan and dextran sulfate: A new method for nanoparticle elaboration. M. Costalat, L. David, T. Delair. Carbohydrate polymers 102, 717-726 (2014).

- Controlling the complexation of polysaccharides into multi-functional colloidal assemblies for nanomedicine. M. Costalat, P. Alcouffe, L. David, T. Delair. Journal of Colloid and Interface Science 430, 147-156 (2014).
- Macro-hydrogel versus nanoparticle formation by the controlled polyelectrolyte complexation of polysaccharides. M. Costalat, P. Alcouffe, L. David, T. Delair. (à soumettre au Journal Carbohydrate Polymers en tant que short communication)

Après une conclusion du manuscrit, nous proposerons les perspectives de ce travail.



Première partie.

Les complexes polyélectrolytes :  
de la solution à la formation de  
matériaux structurés

---



## I. Structure et dynamique des polyélectrolytes en solution

La formation de complexes polyélectrolytes repose sur la neutralisation de deux polymères de charges opposées dissouts en solutions aqueuses. Les caractéristiques des objets formés vont dépendre des propriétés physico-chimiques des solutions initiales de polyélectrolytes, en particulier de la conformation en solution des polymères. Les paramètres ayant un impact sur la conformation sont de deux types soit extrinsèques comme la concentration en polymères, la température, le pH du milieu d'association soit intrinsèques aux espèces mises en jeu comme leur densité de charges, leur hydrophilie respective, la distribution géométrique des groupements fonctionnels, la flexibilité de la chaîne, etc.

Ce chapitre a pour objet de rappeler les principales caractéristiques des polymères en solution. Pour mieux comprendre l'évolution du comportement du chitosane, du sulfate de dextrane et de l'héparine en milieu aqueux, nous introduirons en première partie le comportement des polymères neutres. Nos propos se limiteront cependant à l'identification des régimes de concentration et à la description de la conformation des chaînes par l'introduction de la notion de « blob ». Le comportement des polyélectrolytes sera discuté dans la seconde partie en détaillant particulièrement l'influence des paramètres intrinsèques et extrinsèques sur l'organisation structurale des chaînes. La troisième partie présentera les principales techniques de caractérisation des chaînes polyélectrolytes en solution.

### 1. Organisation des polymères neutres en solution<sup>1,2</sup>

Trois régimes de concentration, dilué, critique et semi-dilué, décrivent les solutions de polymère neutre en « bon » solvant. La solution est dite diluée, lorsque la concentration des chaînes est suffisamment faible pour que celles-ci soient séparées les unes des autres. Lorsque la concentration augmente, les chaînes se rapprochent jusqu'à atteindre une concentration critique de recouvrement  $C^*$ , à partir de laquelle les chaînes sont enchevêtrées. Cette concentration  $C^*$  est définie par :

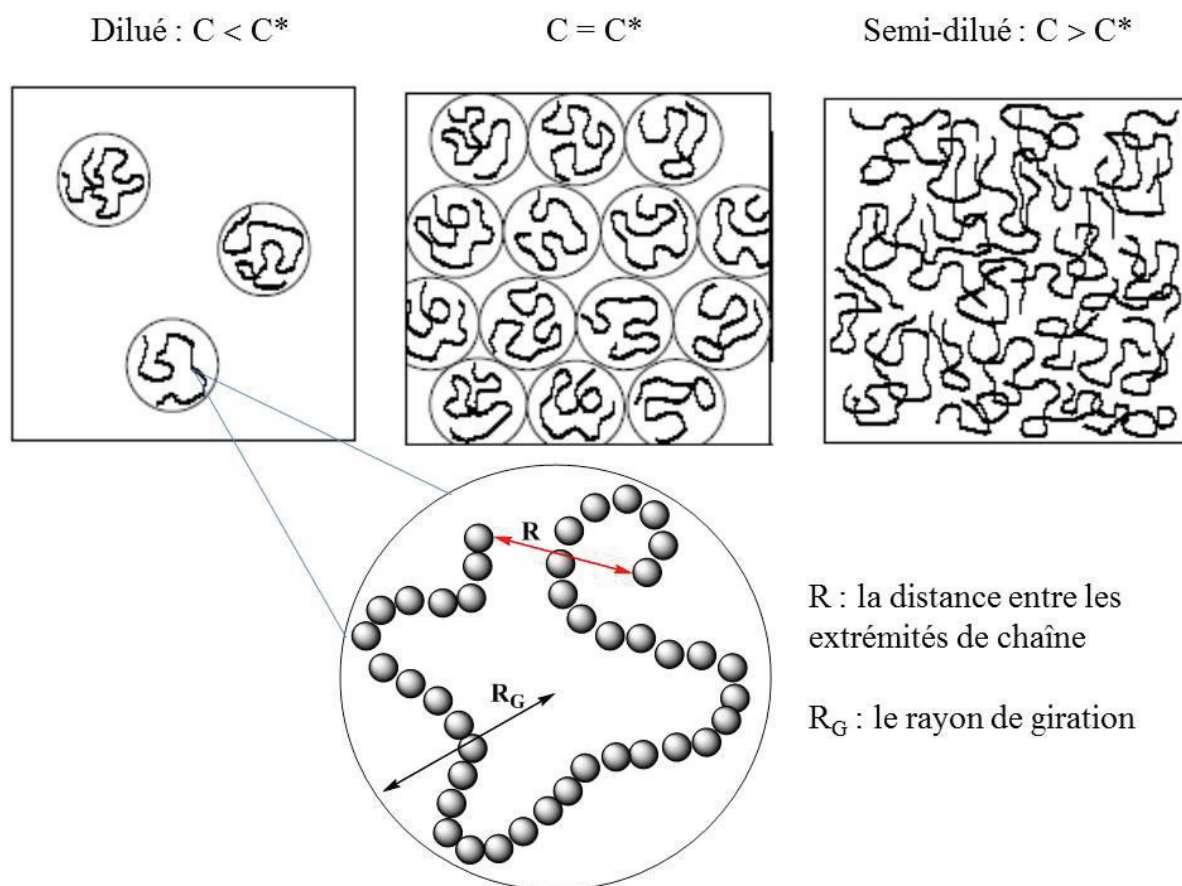
$$C^* = \frac{M}{N_A \frac{3}{4} \pi R_G^3} \quad (1)$$



$M$  est la masse molaire du polymère,  $N_A$  le nombre d'Avogadro et  $R_G$  le rayon de giration de la macromolécule.

Ainsi, la concentration critique est plus importante lorsque la masse molaire du polymère est faible. Ce paramètre peut notamment être déterminé à partir de la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  en considérant la relation,  $C^* [\eta] \approx 1$ .

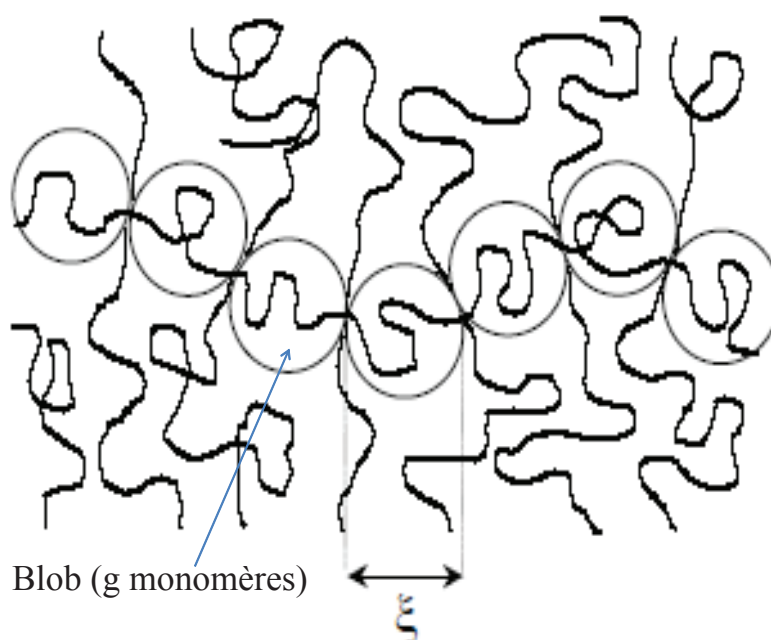
Au-delà de  $C^*$ , le régime est semi-dilué, dans ce cas, les chaînes s'interpénètrent pour former un réseau. La distance moyenne entre deux contacts successifs d'une chaîne avec les autres chaînes est représentée par la longueur de corrélation  $\xi$ . Les différents régimes de concentration sont représentés sur la Figure 1.



**Figure 1.** Représentation schématique de l'organisation des chaînes de polymères neutres en solution à différents régimes de concentration. Le régime concentré est obtenu pour  $C \gg C^*$ .

En milieu semi-dilué, la chaîne polymère peut être représentée comme une série de « blobs » de diamètre  $\xi$ , contenant chacun  $g$  segments qui ne sont pas en interaction avec les segments des autres chaînes (fig. 2). Deux cas peuvent alors être définis :

- les  $g$  segments situés à l'intérieur des blobs obéissent à une statistique de type volume exclu c'est-à-dire en bon solvant :  $\xi \propto g^{3/5}$
- les  $N/g$  blobs suivent, une statistique gaussienne et la distance quadratique moyenne entre les extrémités de la chaîne s'exprime par :  $\langle R^2 \rangle \propto (N/g) \xi^2$ .  $N$  représente le nombre de monomères.



**Figure 2.** Représentation schématique des blobs dans une solution semi-diluée de polymère<sup>2</sup>.

## 2. Les chaînes polyélectrolytes en solution

Les polyélectrolytes sont des macromolécules portant des groupements ionisables reliés à la chaîne par des liaisons covalentes. Dans des solvants polaires comme l'eau, la dissociation des paires d'ions en contreions, et en chaîne polymère chargée (macroions ou polyions) assure la solubilisation. Selon la nature des charges portées par les chaînes

polymères, on parle de polycations, polyanions ou de polyampholytes. Ce dernier cas décrit la situation où le macroion porte des charges positives et négatives.

La nature des groupements ionisables et leur facilité à se dissocier permet de classer les polyélectrolytes comme forts ou faibles<sup>3</sup>. Un polyélectrolyte est dit faible lorsque la dissociation est étroitement liée aux paramètres physico-chimiques du solvant (pH, constante diélectrique, force ionique). La plupart des polyélectrolytes faibles sont des polymères constitués de monomères avec une fonction base faible ou acide faible de type COOH comme l'acide hyaluronique ou les alginates.

Les polyélectrolytes forts regroupent ceux dont la fraction de charge est indépendante de la composition du milieu. Parmi cette famille, on retrouve les polymères portants des groupes acides forts (sulfate, sulfonate) ou encore des ammoniums quaternaires.

Les interactions électrostatiques vont donc jouer un rôle primordial sur l'organisation des chaînes macromoléculaires et la portée de ces interactions pourra être modulée en fonction du pH ou de la force ionique du milieu.

### *2.1 Portée des interactions électrostatiques<sup>4-8</sup>*

Lors de la dissolution d'un polyélectrolyte, les contreions dissociés vont diffuser dans tout le volume. La chaîne chargée est soumise à des interactions électrostatiques exprimées par la loi de Coulomb :

$$U(r) = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon r} \quad (2)$$

$e$  : charge électrique élémentaire ;  $r$  : distance séparant deux charges élémentaires  $e$  ;  $\epsilon_0$  : constante diélectrique du vide ;  $\epsilon$  : constante diélectrique du milieu

La distance minimale entre deux charges de même signe soumise à l'agitation thermique  $k_B T$ , est donnée par la longueur de Bjerrum  $l_B$  :

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon k_B T} \quad (3)$$

Où  $k_B$  est la constante de Boltzmann, et  $T$ , la température absolue. Dans l'eau pure à 25°C ( $\epsilon = 78.5$ ), la longueur de Bjerrum est égale 7.1 Å.

L'introduction d'un électrolyte tel que le sel dans le milieu modifie le potentiel d'interaction  $U(r)$  qui prend la forme d'un potentiel écranté :

$$U(r) = \frac{e^2 l_B}{r} \exp\left(-\frac{r}{K^{-1}}\right) \times k_B T \quad (4)$$

La contribution de l'électrolyte est contenue dans  $K^{-1}$  appelée longueur d'écran de Debye-Hückel. Cette dernière définit la distance à partir de laquelle l'interaction électrostatique entre deux charges sera écrantée par les ions du milieu. Elle est exprimée par :

$$K^{-1} = (8\pi l_B I)^{-1/2} \quad \text{avec } I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2 \quad (5)$$

$I$  est la force ionique du milieu,  $C_i$  la concentration en espèce ionique  $i$  et  $z_i$  la charge.

La longueur d'écran de Debye-Hückel donne donc une estimation de la portée des interactions électrostatiques. Une augmentation de la concentration en espèces ioniques provoquera une diminution de la portée des interactions et, à partir d'une valeur critique en électrolyte, la portée des interactions électrostatiques sera nulle, c'est la notion d'écrantage des charges. Les valeurs de la longueur d'écran rapportées dans le tableau 1 illustrent bien la dépendance à la force ionique de la portée des interactions électrostatiques.

**Tableau 1.** Ordre de grandeur de la longueur de Debye-Hückel dans des solutions aqueuses<sup>8</sup>

Solutions	Longueurs de Debye-Hückel
Eau pure théorique	$\sim 1000 \text{ nm}$
Eau ultra-pure de laboratoire	$\sim 100 \text{ nm}$
Solution de NaCl 0.001 M	$\sim 10 \text{ nm}$
Solution de NaCl 0.1 M	$\sim 1 \text{ nm}$
Fluide biologique	$\sim 0.8 \text{ nm}$
Solution de NaCl 1M	$\sim 0.3 \text{ nm}$

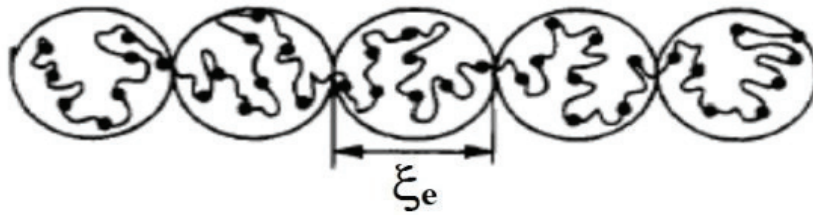
D'autres paramètres comme la densité de charges ou la concentration en polymère pourront aussi moduler les interactions et donc avoir un effet sur l'état conformationnel de la macromolécule dans le milieu.

## 2.2 Conformation des polyélectrolytes en solution<sup>9-13</sup>

### 2.2.1 Influence de la densité de charge

#### 2.2.1.1 Chaîne faiblement chargée<sup>9-16</sup>

Dans une solution diluée, exempte de sel, où les contreions sont distribués de manière homogène dans le solvant, la longueur d'écran de Debye est grande. La macromolécule adopte une conformation étirée et peut être représentée comme une succession de blobs électrostatique de taille  $\xi_e$  (Fig. 3). Au sein de ces blobs, la chaîne n'est pas perturbée par les interactions électrostatiques puisque celles-ci sont compensées par l'énergie thermique. Elle adopte alors une conformation similaire à celle des polymères neutres.



**Figure 3.** Représentation schématique d'une chaîne polyélectrolyte faiblement chargée en solution exempte de sel<sup>13</sup>. Les cercles pleins représentent des groupements chargés. La chaîne est étirée (en forme de bâtonnet) et présente une configuration en blobs électrostatiques de taille  $\xi_e$ .

L'équilibre entre l'énergie thermique du solvant et l'énergie d'interaction électrostatique détermine la taille  $\xi_e$  des blobs<sup>17</sup>. Les approches suivantes permettent de la quantifier :

- $\xi_e \approx a (a/l_B)^{3/7} f^{-6/7}$  : dans un bon solvant
- $\xi_e \approx a (a/l_B)^{1/3} f^{-2/3}$  : dans un mauvais solvant

$a$  est la longueur d'un monomère, et  $f$  la fraction de monomères chargés.

### 2.2.1.2 Chaîne fortement chargée<sup>7,8,13,18-20</sup>

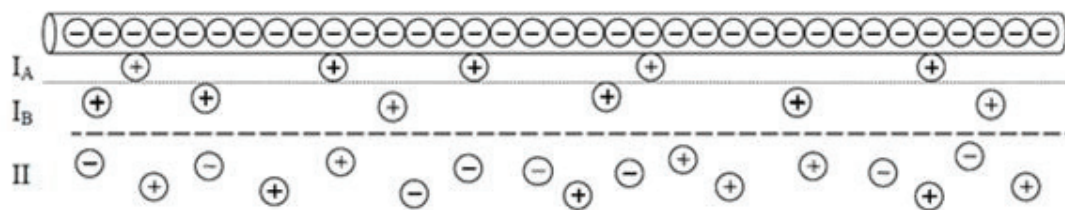
Les polyélectrolytes sont dits fortement chargés lorsque le potentiel électrostatique des macroions est très élevé. Dans la solution, la distribution des contreions et la dynamique de la chaîne polyélectrolyte sont fortement affectées. De fortes interactions répulsives entre groupements chargés a lieu ce qui conduirait à une expansion de la chaîne que l'on pourrait assimiler à un bâtonnet rigide<sup>16</sup>. Ainsi, le blob électrostatique devrait avoir la taille d'une unité monomère. D'autre part, de fortes interactions électrostatiques entre macroions et contreions subsistent à cause des phénomènes de condensation à la périphérie du polyélectrolyte. Manning et Oosawa ont été les premiers à décrire ce phénomène pour les polyélectrolytes à géométrie de type bâtonnet (Fig. 4). Selon ces auteurs, la condensation est directement liée à la densité de charge du macroion qui est estimée à partir du paramètre de Manning  $\xi_M$  :

$$\xi_M = \frac{l_B}{b} \quad (6)$$

$b$  désigne la distance moyenne entre deux charges voisines de la chaîne.

Lorsque  $\xi_M$  atteint une valeur critique  $\xi_{Mcrit} = Z^{-1}$ , les contreions ont tendance à se condenser sur la chaîne macromoléculaire. Si l'on considère des contreions monovalents ( $Z=1$ ), la condensation prédomine lorsque  $\xi > 1$ , mais n'existe pas lorsque  $\xi < 1$ . Ainsi, il y a donc différentes populations de contreions autour du macroion selon trois zones distinctes :

- $I_A$  : zone de condensation. Les contreions sont liés aux macroions de charges opposées et ne peuvent se mouvoir librement.  $\xi_M > 1$ .
- $I_B$  : les contreions peuvent se déplacer librement dans un volume restreint appelé volume de condensation
- $II$  : atmosphère de Debye-Hückel. Les contreions et les co-ions coexistent.  $\xi_M < 1$ .



**Figure 4.** Représentation schématique d'un polyélectrolyte rigide, fortement chargé, selon la théorie de Manning<sup>8,20</sup>.

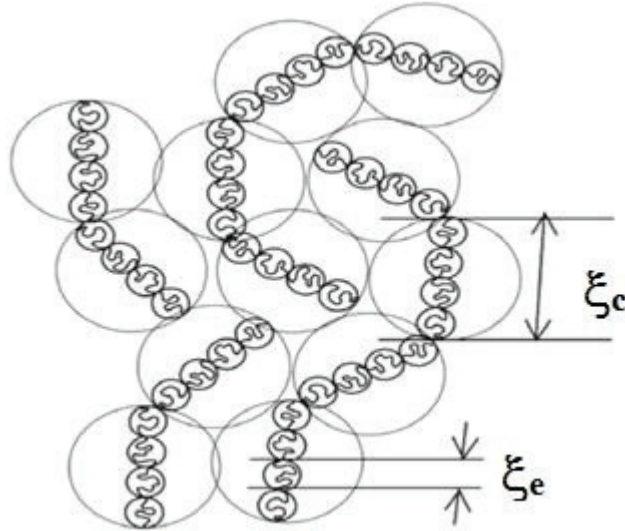
## 2.2.2 Influence de la concentration en polymère<sup>14-17,21</sup>

### 2.2.2.1 Régime dilué<sup>17</sup>

En solution diluée, ( $C_p < C^*$ ), la longueur de Debye-Hückel est très élevée devant  $R$ , la distance des extrémités de chaîne. Les blobs électrostatiques interagissent fortement et forment une chaîne rigide de blobs. Ainsi, les macroions adoptent une conformation étendue due à la répulsion électrostatique maximale entre les chaînes.

### 2.2.2.2 Régime semi-dilué<sup>14,17</sup>

Lorsque la concentration en polymère est supérieure à  $C^*$ , la force ionique due aux contreions et aux chaînes elles-mêmes est telle, qu'un écrantage partiel des charges est observé. Par conséquent, la longueur d'écran de Debye est inférieure à  $R$ . Ainsi, la chaîne macromoléculaire adoptera une conformation partiellement repliée sur elle-même. De Gennes et al. supposent que dans un tel régime, à l'instar des polymères neutres, les macroions peuvent s'enchevêtrer sans ordre pour former un réseau isotrope. La maille de ce réseau est définie par la longueur de corrélation  $\xi_c$  qui est à la fois la distance à laquelle les chaînes se repoussent mutuellement et la distance en-dessous de laquelle la conformation de la chaîne est celle d'un régime dilué (Fig.5).



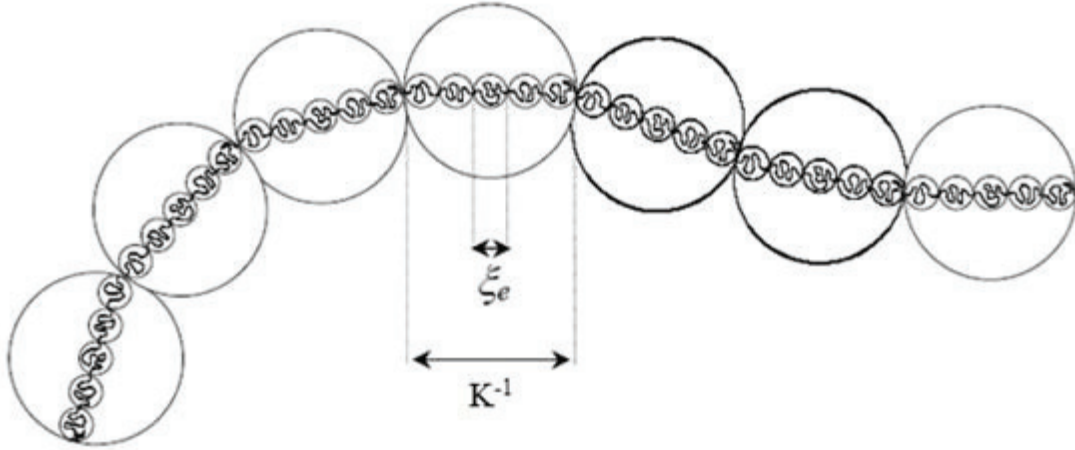
**Figure 5.** Chaîne polyélectrolyte en régime semi-dilué<sup>17</sup>. La chaîne est une marche aléatoire de blob de corrélation de taille  $\xi_c$  constitué de configuration de chaînes étirées de blobs électrostatiques de taille  $\xi_e$ <sup>22</sup>.

Pour des distances d'observation comprises entre  $\xi_e$  et  $\xi_c$ , les interactions électrostatiques prédominent, la chaîne adopte alors une conformation étirée de blobs électrostatique. Au-delà de  $\xi_c$ , à cause de l'écrantage des charges, la chaîne se comporte comme un polymère neutre et adopte une conformation de marche aléatoire de blobs de corrélation<sup>17</sup>.

### 2.2.3 Influence d'un électrolyte<sup>4,13</sup>

Au vue des équations 5, on comprend que la concentration en électrolyte dans la solution ait un effet majeur sur la conformation des polyélectrolytes. Pour des valeurs de  $K^{-1}$  inférieures à la distance entre les extrémités de chaîne  $R$ , la chaîne perd sa rigidité à grande échelle et adopte une configuration de polymère neutre. A des échelles plus courtes mais supérieure à  $\xi_e$ , la chaîne est rigide sur une échelle comprise entre  $\xi_e$  et  $K^{-1}$  (Fig. 6).





**Figure 6.** Représentation schématique d'une chaîne polyélectrolyte en présence de sel<sup>8</sup>.

La perte de rigidité provoquée par l'ajout d'électrolyte peut être quantifiée à partir de la longueur de persistance électrostatique  $L_{pe}$  :

$$L_{pe} = \frac{l_B (K^{-1})^2}{4 b^2 \xi_M^2} \quad (7)$$

La longueur de persistance totale ( $L_p$ ) de la macromolécule est donné par :

$$L_p = L_{pe} + L_{pi} \quad (8)$$

$L_{pi}$  représente la longueur de persistance intrinsèque. Elle définit la rigidité propre de la chaîne sans tenir compte des charges.

### 3. Techniques de caractérisation des polyélectrolytes

#### 3.1 Viscosimétrie capillaire

La viscosité est une grandeur à partir de laquelle on peut obtenir des informations quantitatives sur les caractéristiques hydrodynamiques, géométriques et interactionnelles des

polymères en solution. Ces propriétés dépendent à la fois, de la densité de charges, de la concentration, de la masse et des dimensions des chaînes polymères. Ce paragraphe s'efforcera de démontrer la particularité de la dynamique des polyélectrolytes en comparaison de leurs homologues neutres.

### 3.1.1 Cas des polymères neutres<sup>23-25</sup>

La mise en solution d'une macromolécule crée des interactions entre le polymère et le solvant qui vont modifier les propriétés d'écoulement de la solution par rapport au solvant pur. La mesure du temps d'écoulement de la solution dans un capillaire détermine la valeur de la viscosité. Pour des solutions newtoniennes, cette grandeur constitue en quelque sorte la résistance à l'écoulement du polymère.

Si l'on considère  $\eta_0$  la viscosité du solvant,  $\eta$  celle de la solution,  $t_0$  le temps d'écoulement du solvant, et  $t$  celui de la solution, on peut définir en régime diluée ( $C_p < C^*$ ):

- la viscosité relative :

$$\eta_{\text{rel}} = \frac{t}{t_0} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (9)$$

- la viscosité spécifique qui permet de s'affranchir de la contribution du solvant :

$$\eta_{\text{spe}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (10)$$

- la viscosité réduite permet de s'affranchir de la dépendance de la viscosité à la concentration en polymère

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C_p} \quad (11)$$

- et la viscosité intrinsèque

$$[\eta] = \lim_{C_p \rightarrow 0} \eta_{\text{red}} \quad (12)$$

$C_p$  est la concentration en polymère.

Dans le cas des polymères neutres, la variation de la viscosité réduite avec la concentration en macromolécule est linéaire. Ce lien est aussi montré par la relation empirique de Huggins<sup>25</sup> :

$$\eta_{\text{red}} = [\eta] + k'[\eta]^2 C_p \quad (13)$$

La constante de Huggins  $k'$  est associée à la qualité du solvant. Plus sa valeur est faible, meilleur sera le solvant.

Pour les solutions newtoniennes, la viscosité intrinsèque donne accès à plusieurs paramètres caractéristiques de la macromolécule. Parmi ceux-là on peut citer la masse molaire, donnée par la relation de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS), qui s'applique à des échantillons relativement isomoléculaires:

$$[\eta] = K M_v^a \quad (14)$$

Concrètement, la masse obtenue de cette manière constitue la masse molaire moyenne viscosimétrie donnée par l'expression suivante :

$$\overline{M}_v = \left[ \frac{\sum_i C_i M_i^a}{\sum_i C_i} \right]^{1/a} \quad (15)$$

Les constantes  $K$  et  $a$  dépendent du polymère, du solvant et de la température. La valeur de  $a$  donne accès à la conformation de la chaîne en solution. Elle équivaut à 0.5 lorsque la chaîne adopte une configuration de pelotes statistiques ou à 1.8 pour une organisation en bâtonnet rigide<sup>26</sup>.

La viscosité intrinsèque donne également accès au rayon de giration  $R_G$  des chaînes par l'intermédiaire de la relation de Fox et Flory (en bon solvant) :

$$[\eta] = \phi_0 \frac{\langle R^2 \rangle^{3/2}}{M} = 6^{3/2} \phi_0 \frac{\langle R_G^2 \rangle^{3/2}}{M} \quad (16)$$

$\phi_0$  est la constante universelle de Flory qui vaut  $2,5 \times 10^{23}$  si  $[\eta]$  est exprimée en  $\text{mL.g}^{-1}$ . Elle est indépendante du système polymère-solvant-température. .

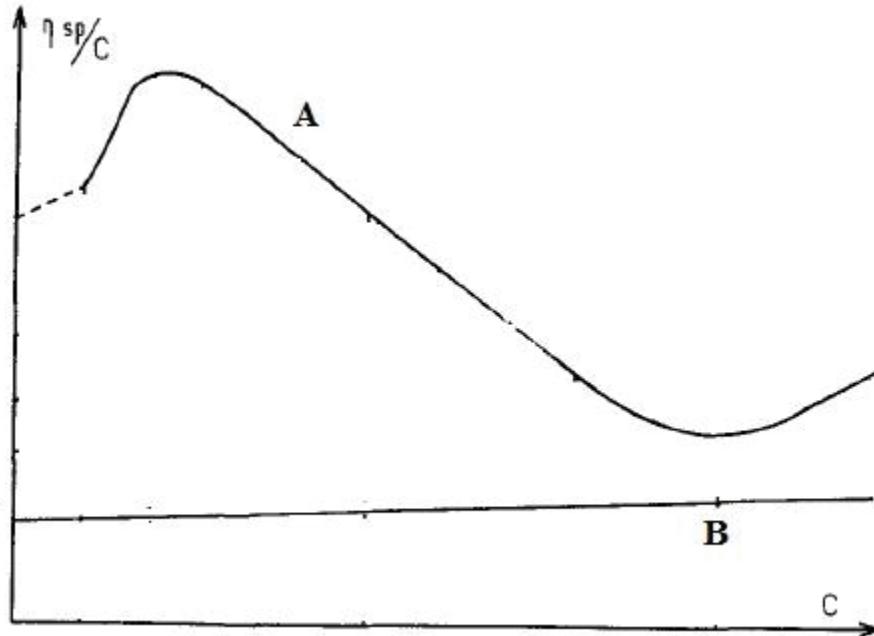
### 3.1.2 Cas des polyélectrolytes<sup>13,27-29</sup>

La présence de charges sur la chaîne polymère influence le comportement hydrodynamique des polyélectrolytes. Ainsi, en absence de sel, la viscosité réduite croît rapidement avec la dilution et avec le degré de dissociation. Ce phénomène est provoqué par des effets électrovisqueux classés en trois catégories. Tout d'abord, les **effets électrovisqueux primaires** qui sont directement responsables de la modification de la viscosité et ce indépendamment de la concentration. Ils ont pour origine la dissipation d'énergie provoquée par la déformation par l'écoulement de la couche de contreions entourant le macroion. Ensuite, les **effets électrovisqueux secondaires** qui proviennent de la perturbation des atmosphères ioniques provoquée par la collision entre les particules chargées. L'énergie de frottement ainsi dissipée dépend fortement de la concentration en polymère. Et enfin, les **effets électrovisqueux tertiaires** qui rendent compte du changement de conformation du macroion au fur et à mesure qu'il s'ionise et que la concentration diminue.

La variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration n'est donc pas linéaire (Courbe A Fig. 7). Dans ces conditions, le modèle empirique de Fuoss<sup>30</sup> permet de déterminer la viscosité réduite par l'expression :

$$\eta_{\text{red}} = \frac{A}{1 + B C_p^{1/2}} \quad (17)$$

Où  $A$  et  $B$  sont des constantes, et  $C_p$  la concentration en polymère. Lorsque la concentration tend vers 0, la valeur de  $A$  correspond à la viscosité intrinsèque du polyélectrolyte.



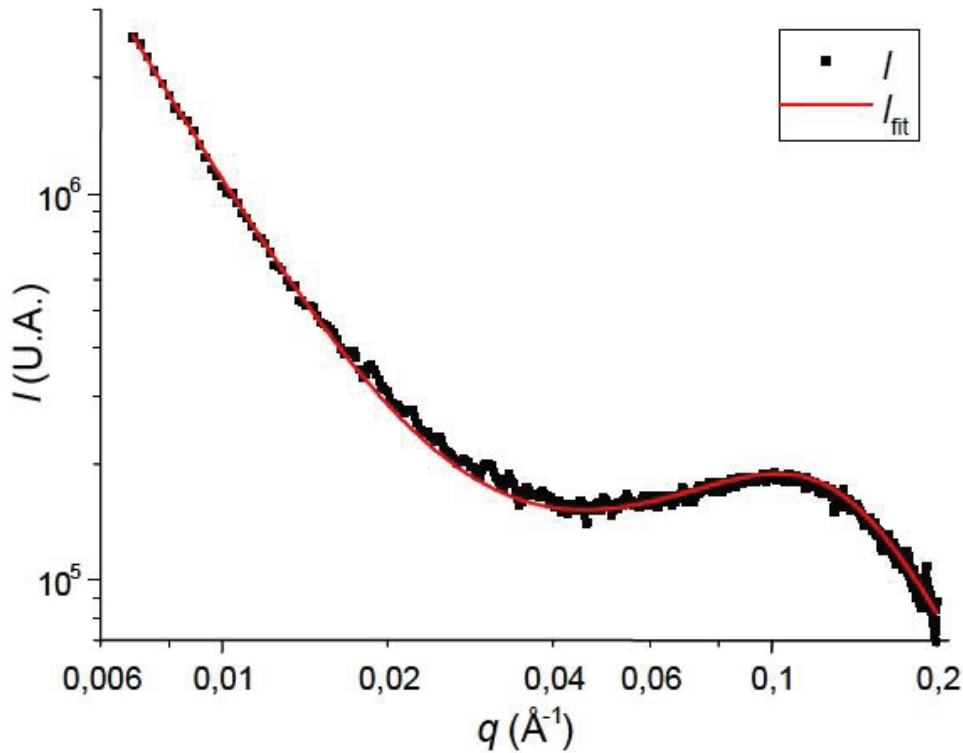
**Figure 7.** Représentation de la variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration  $C$  en polyélectrolyte. A : courbe obtenue en absence de sel. B : courbe obtenue à force ionique élevée (ajout de sel en quantité élevée)<sup>29</sup>.

Pour écranter les répulsions électrostatiques et donc rester dans les conditions d'application de l'équation de Huggins correspondant aux polymères neutres, des électrolytes sont ajoutés dans la solution. Cependant, les dilutions doivent être isoioniques c'est-à-dire à force ionique constante. Le comportement d'un tel système est représenté sur la courbe B (Fig. 7). L'extrapolation à concentration nulle donne la viscosité intrinsèque et la constante de Huggins en fonction de la force ionique.

### 3.2 Diffusion des rayons X aux petits angles<sup>22,31,32</sup>

L'analyse des polyélectrolytes par la technique de diffusion des rayons X, souvent sous faisceau synchrotron, présente un pic d'intensité  $I(q)$  maximum appelé aussi « pic polyélectrolyte »<sup>33–35</sup> (Fig. 8). Celui-ci est caractéristique des solutions à faible quantité de sels ajoutés et représente l'établissement d'un ordre local macromoléculaire au sein de la solution. La position du maximum du pic polyélectrolyte  $q_{\max}$  donne accès à une longueur de corrélation par :

$$q_{\max} = \frac{1}{\xi} \text{ ou } \frac{2\pi}{\xi} \quad (18)$$



**Figure 8.** Diagramme de diffusion des rayons X d'une solution d'alginate de sodium en l'absence de sel ajoutés:  $I$  – intensité de diffusée,  $q$  – vecteur de diffusion. ■ Données expérimentales et — modélisation des données par une loi de Lorentz modifiée<sup>36</sup>. (Résultats obtenus sur la ligne BM2-D2AM de l'ESRF)

De nombreuses études montrent que  $q_{\max}$  se déplace vers les plus grands vecteurs de diffusion lorsque l'on augmente la concentration  $C_p$  en polyélectrolyte<sup>14,37-39</sup>. Ceci est décrit par une loi en puissance :

$$q_{\max} \propto C_p^\alpha \quad (19)$$

La valeur de  $\alpha$  permet de définir le régime structural du polyélectrolyte, en liaison avec la conformation de la chaîne polymère en solution. La macromolécule est structurée par des domaines (perles) hydrophobes lorsque  $\alpha = 1/3$  et suit un régime polyélectrolyte fort, hydrophile lorsque  $\alpha = 1/2$ <sup>33</sup>.

La position du pic de diffusion  $q_{\max}$  traduit donc l'organisation spatiale et l'état de dispersion/solvatation des chaînes polyelectrolytes dans la solution sous l'effet des répulsions électrostatiques entre segments et l'attraction des contre-ions. Si sa dépendance avec la concentration et la charge nette ne fait plus aucun doute, elle peut en toute logique, également varier avec d'autres paramètres, comme la taille du monomère, la nature et la qualité du solvant (ce qui peut agir sur la longueur de Bjerrum  $l_B$ ) etc.

Dans le domaine du diagramme de diffusion aux petits angles, on observe souvent une remontée de l'intensité diffusée. Cette caractéristique est due à la présence de particules ou agrégats en solution, à plus grande échelle.

Dans les conditions de particules ou d'objets diluées, la diffusion des rayons X ou la diffusion de lumière donne en principe accès au rayon de giration  $R_G$  de la macromolécule par la relation de Guinier :

$$I(q) = I_0 \exp\left(-\frac{R_G^2 q^2}{3}\right) \quad (20)$$

Où  $I_0$  est l'intensité à vecteur de diffusion nul. Cette relation est valable lorsque  $qR_G \ll 1$ . Pour les grandes valeurs de  $q$ ,  $qR_G \gg 1$ , la loi de Guinier n'est plus valable. Lorsque la

diffusion est due à des entités nanométriques à interface nette, la courbe de diffusion peut être ajustée par la loi de Porod :

$$I(q) = \frac{C}{q^4} \quad (21)$$

Où C est la constante de Porod (proportionnelle à la surface totale des particules). Dans tous les cas, on peut ajuster le comportement asymptotique à grandes valeurs de  $q$  avec une loi de Porod généralisée ( $I(q)=C/q^\alpha$ ). La valeur de l'exposant de la loi de Porod généralisée est reliée à la morphologie de la surface des objets diffusants, ou à leur structure interne, c'est-à-dire à des détails à plus petite échelle que la valeur du rayon de giration.

La construction de modèles de diffusion pour décrire des systèmes hétérogènes à différentes échelles est possible avec le modèle de Beaucage<sup>40</sup>. Ce modèle fondé sur les équations 20 et 21 des lois de Guinier et Porod est exprimée par la relation :

$$I(q) = I_0 \exp\left(-\frac{R_G^2 q^2}{3}\right) + B \left(\frac{p(qR_G)}{q}\right)^4 \quad (22)$$

B est une constant ajustable et  $p(qR_G)$  est donné par la relation:

$$p = \left[ \operatorname{erf}\left(\frac{qR_G}{\sqrt{6}}\right) \right]^3 \quad (23)$$

L'équation 23 représente le “lissage” de la zone de transition entre le domaine de Guinier et de Porod généralisé<sup>40</sup>. Cette fonction est très proche de zéro lorsque  $qR_G < 1$  et de 1 lorsque  $qR_G > 1$ . La loi de diffusion est donc équivalente à la loi de Guinier aux petits angles et à la loi de Porod généralisée aux plus grands angles. La somme de différents termes comparables à l'équation 22 permet de reconstruire un système hétérogène à plusieurs échelles<sup>41,42</sup>.



## Conclusion

La description du comportement en solution des polyélectrolytes reste complexe car une grande variété de paramètres est à prendre en compte. Les effets des charges, de leur densité sur la chaîne polymère et de la force ionique représentent un premier groupe d'interactions, mais l'influence de la qualité du solvant peut compliquer fortement la description de la structure (ex : polyélectrolytes hydrophobes). Cependant le bilan de ces interactions complexes constitue une première approche nécessaire à la compréhension de l'organisation et des propriétés de ces systèmes en solution.

## II. Les polyélectrolytes à base de polysaccharides

Les polysaccharides sont les macromolécules les plus abondantes de la biomasse car ils constituent les éléments structuraux majeurs des végétaux ou animaux. Ils possèdent un grand nombre de groupes réactifs, qui contribuent à la diversité de leur structure et de leurs propriétés. Les polysaccharides présentent des propriétés en solutions<sup>43,44</sup>, physico-chimiques<sup>45,46</sup>, biologiques<sup>47,48</sup> et pharmacologiques<sup>49-52</sup> très diverses, ce qui justifie l'intérêt que leur portent de nombreuses industries. Ils sont notamment utilisés dans l'industrie agroalimentaire<sup>45,53</sup>, cosmétique<sup>54</sup>, biomédicale<sup>46,48</sup>, pharmaceutique<sup>49</sup> etc. En générale, d'origine naturelle, les polysaccharides sont faiblement toxiques, biodégradables et hydrophiles par la présence de groupements hydroxyle, carboxylate, sulfate, ou encore amine. Ces groupements fonctionnels sont impliqués dans les nombreuses propriétés des polysaccharides comme, par exemple, pour la mucoadhésion du chitosane<sup>55,56</sup> lui permettant de se lier aux interfaces biologiques<sup>57</sup>.

Ce second chapitre sera consacré aux caractéristiques en solution des polysaccharides que nous avons utilisés dans notre travail expérimental: le chitosane, le sulfate de dextrane et l'héparine.

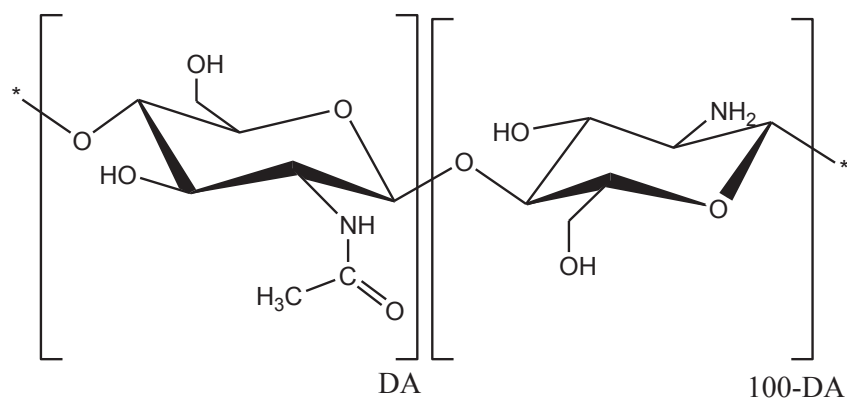
## 1. Le chitosane

### 1.1 Définition, origine et structure

Le chitosane est sur le plan de sa structure chimique un polysaccharide de la famille des glycosaminoglycane (GAG). Bien que présent à l'état natif dans la paroi cellulaire de certaines bactéries, levures et champignons (les zygomycètes) ou dans la paroi abdominale de certains insectes comme les reines des termites<sup>58</sup>, sa production industrielle reste la N-desacétylation chimique en milieu alcalin<sup>58</sup> de la chitine.

La chitine est un composant structurel important des exosquelettes des arthropodes (crustacés, insectes, arachnides etc.)<sup>59</sup> et des endosquelettes des céphalopodes (seiche, calamars, etc.)<sup>59-61</sup>. Elle compte parmi les polysaccharides les plus répandus dans la biomasse, après la cellulose. Sa production annuelle est en constante augmentation<sup>58</sup>, environ  $10^{10}$ - $10^{12}$  T, soulignant ainsi le grand intérêt que suscite ce polymère naturel en raison de son abondance, de sa biodégradabilité, biocompatibilité et non toxicité.

Le chitosane et la chitine sont des copolymères linéaires constitués d'un enchaînement d'unités monomères N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) et D-glucosamine (GlcN) reliés par une liaison glycosidique de type  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Fig. 9).



**Figure 9.** Structure chimique du chitosane et de la chitine.

Aucune nomenclature officielle ne permet de différencier la chitine du chitosane. Leur classification se fait indirectement par la valeur de la fraction molaire d'unités N-acétylées présente le long de la chaîne polymère et qui s'exprime à travers le degré d'acétylation (DA).

$$DA = \frac{\text{Nombre de résidus GlcNAc}}{\text{Nombre total de résidus}} \times 100 \quad (24)$$

Une autre définition, amorcée par Rouget en 1859 à la découverte du chitosane, permet de définir le copolymère comme de la chitine ou du chitosane à partir de leurs propriétés de solubilité<sup>61,62</sup>.

La chitine est insoluble aussi bien dans l'eau que dans les solvants organiques les plus courants. Les acides concentrés la dégradent. Elle est soluble dans le diméthylformamide (DMF) ou diméthylacétamide (DMAc) en présence de chlorure de lithium<sup>58,63,64</sup>. Cette définition de la chitine correspond aux *DA*s supérieurs ou égaux à 70%<sup>65</sup>. En revanche, la désacétylation partielle en milieu basique de ce polymère jusqu'à un *DA* inférieur à 40% - 70 %<sup>65,47</sup>, conduit au chitosane qui, lui, est soluble en solution aqueuse acide diluée – à l'exception de l'acide sulfurique – par protonation des groupements amine. Si l'on considère le chitosane comme une polyamine, cette solubilité dépend étroitement de la valeur du pH de la solution. En effet, le groupement amine du chitosane a un pKa avoisinant les 6,2 -7, en fonction de la fraction molaire du groupement acétamide contenus dans la chaîne<sup>66</sup>. La protonation de ses amines confère au chitosane son comportement de polycation.

La valeur limite de solubilité des deux composés – déjà imprécise – doit encore être prise avec précaution puisqu'elle dépend de nombreux paramètres comme l'origine de la matière première (crabes, crevettes, calamars etc.), le procédé envisagé pour désacétyler la chitine qui peut induire une dépolymérisation plus ou moins prononcée du polymère, le degré de polymérisation en masse (DPw), le pH, la force ionique du milieu de solubilisation et la distribution (statistique, bloc) des unités N-acétylées le long de la chaîne macromoléculaire. La présence de blocs d'unités N-acétylées confère au polymère un caractère hydrophobe.

## 1.2 Comportement en solution

### 1.2.1 Solubilité

Le chitosane est insoluble dans l'eau, sous sa forme amine libre, à cause de l'existence de nombreuses liaisons hydrogènes entre les fonctions hydroxyle, amine, acétamide et éther, ainsi que les interactions hydrophobes. La protonation des groupements amine apporte l'énergie électrostatique suffisante pour détruire ces réseaux de liaisons et permettre la solvation des chaînes.

Lorsque le pH augmente, au-delà de 6,5, la déprotonation des fonctions amine primaire provoque la précipitation du chitosane. Comme pour tous les polyélectrolytes, le pKa du chitosane dépend du degré de neutralisation du polymère et aussi du *DA*. En fait, le paramètre important est la densité de charges sur la macromolécule. Sorlier et al<sup>66</sup> ont étudié ce comportement particulier du chitosane et ont ainsi montré sur une gamme de *DA* comprise entre 5 et 89% que le pKa<sub>0</sub> intrinsèque du chitosane augmentait avec le *DA* : pKa<sub>0</sub> ~6,5 pour les *DA*s < 25 % et pKa<sub>0</sub> > 6,8 pour les *DA*s > 60 %.

Il a aussi été rapporté que les gênes stériques induits par les groupements acétyles rigidifient les chaînes du polymère et de cette manière favorisent leur hydratation<sup>67</sup>, mais le groupement acetamide est lui-même assez polaire pour développer des interaction hydrogène avec l'eau.

La solubilité du chitosane varie également en fonction de la distribution des groupements acétamide le long de la chaîne polymère<sup>68,69</sup>, une distribution statistique étant plus favorable à la solubilisation qu'une distribution en blocs. De plus, la gamme de pH correspondant à la solubilité du chitosane dans l'eau augmente lorsque le *DA* s'accroît, à cause de la rigidification conférée par la gêne stérique induite par la présence d'un nombre croissant de groupes N-acétyle qui favorise l'hydratation des chaînes<sup>70</sup>. A partir d'un *DA* proche de 60%, le chitosane est soluble dans l'eau quel que soit le pH<sup>71</sup>. Cependant, la dissolution « directe » dans un pH neutre est impossible. Il est en effet indispensable de passer par une pré-étape de solubilisation en milieu acide pour ensuite augmenter le pH jusqu'à la valeur souhaitée. Dans le cas des chitosanes à distributions de type bloc, le comportement en solution résulte de la présence de séquences de *DA* élevés qui a pour conséquence la diminution de la plage de solvation.

D'autre part, la solubilisation du chitosane dans des solutions d'acides concentrés est impossible car la force ionique élevée provoque la diminution des interactions électrostatiques répulsives interchaînes par écrantage des charges<sup>72,73</sup> et, par voie de conséquence, l'insolubilité des chaînes chitosane.

Comme beaucoup de chaîne macromoléculaire, la masse molaire joue aussi un rôle important dans la solvation du chitosane. En effet, plusieurs études<sup>74-77</sup> montrent que la solubilité du chitosane diminue avec l'augmentation de sa masse molaire.

De nombreux travaux reportent l'étude de solubilité du chitosane<sup>67,78</sup>. Cependant il est surprenant de voir le manque d'information dans la littérature sur l'effet de la concentration en électrolyte sur la solubilité de ce polymère. Les travaux de Cataldo et al.<sup>79</sup> menés en ce sens et qui consistent à mesurer la protonation d'un chitosane commercial ayant une masse molaire de 340 kg.mol<sup>-1</sup> et un *DA* de 15-25% par titration potentiométrique en présence de NaCl à des concentrations variables comprises entre 0,1M et 3M est à prendre avec précaution au regard des résultats obtenus au cours de cette thèse qui ont démontré que dans ces gammes de *DA*, le chitosane précipite en présence de sel à concentration supérieure à 0,9 mol.L<sup>-1</sup>.

### 1.2.2 Conformation en solution

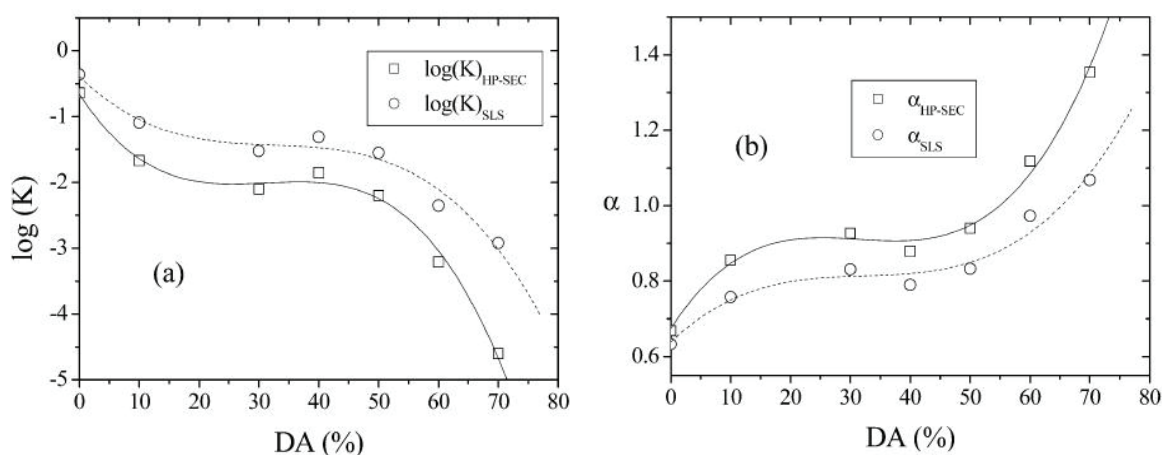
De nombreux travaux ont été entrepris pour étudier l'influence de la densité de charge et des effets stériques des groupes acétylés sur la conformation structurale du chitosane en solution. Les résultats de ces travaux sont cependant difficiles à comparer à cause des origines diverses des échantillons. La variation des valeurs des paramètres de MHKS mesurées par différentes équipes témoignent de cette difficulté<sup>26,80-85</sup>. De manière générale, ces travaux s'accordent à dire que le paramètre  $\alpha$  varie entre 0,58 et 1,12<sup>80-84</sup> avec le *DA*. Ceci montre que le chitosane en solution peut être considéré comme désordonné et relativement rigide. Pour Wang et al.<sup>84</sup> cette structure rigide est la conséquence de l'encombrement stérique généré par les motifs acétylés et de la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires qui empêcherait la rotation des cycles glycosidiques.

La longueur de persistance est aussi un paramètre clé dans l'étude de la conformation des polysaccharides. L'équipe de Rinaudo<sup>77,80,86,87</sup> a montré à partir de chitosane obtenus par désacétylation homogène une augmentation de la longueur de persistance avec le *DA* : 11 nm

pour un DA de 2% et 15 nm pour un  $DA$  de 60%. La conclusion est la même ici, à savoir une augmentation de la rigidité des chaînes avec le  $DA$ . Cependant pour les chitosane obtenus par désacétylation hétérogène, le constat est tout autre. Cette équipe démontre en effet le maintien de la longueur de persistance à une valeur fixe de 11 nm quel que soit le  $DA$ . La distribution des résidus acétylés exerce donc aussi son influence sur la rigidité des chaînes chitosane en solution.

Terbojevich et al.<sup>88</sup> proposent quant à eux, par mesure de diffusion statique de la lumière, des valeurs de persistance de 189 Å et de 224 Å pour un  $DA$  de 15% et 42% (DPw 1000-7000). Pour ces auteurs l'augmentation de la rigidité des chaînes avec le  $DA$  fait suite à la présence de forte liaisons hydrogènes intramoléculaires qui stabiliseraient le polymère.

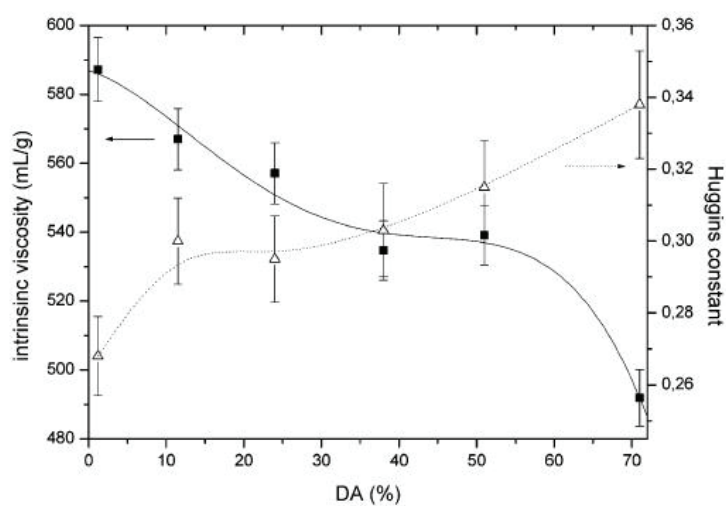
Tous ces travaux divergent dans les valeurs obtenues de par la diversité des échantillons employés. Dans ce contexte l'établissement de loi universelle reste complexe. Lamarque et al.<sup>85</sup> ont proposé une loi de comportement du chitosane en fonction du  $DA$  dans un tampon 0,2M acide acétique/0,15 M acétate d'ammonium à pH 4,5. Cette étude menée sur une large gamme de  $DA$  compris entre 2 et 70% de faible  $I_p$  montre que les paramètres  $K$  et  $\alpha$  de la relation de MHKS varient en fonction du  $DA$  (Fig. 10). La diminution de solubilité du chitosane avec le  $DA$ , que montre la baisse de  $\log K$  quand le  $DA$  augmente, s'accompagne d'une rigidification de la macromolécule, ce que suggère l'augmentation de  $\alpha$  avec le  $DA$ .



**Figure 10.** Variation de (a)  $\log(K)$  et (b)  $\alpha$ , les paramètres de MHKS en fonction du  $DA$  selon Lamarque et al. Paramètres obtenus à partir de la mesure de  $M_w$  par — HP-SEC (High performance-Size exclusion chromatography) et --- SLS (Static Light Scattering)<sup>85</sup>.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Schatz et al.<sup>89</sup> qui ont étudié les effets des paramètres physicochimiques tels que la viscosité intrinsèque (Fig. 11), le rayon de giration, l'indice de réfraction  $dn/dc$ , ou encore le second coefficient de Viriel, en fonction du  $DA$  sur le comportement en solution du chitosane. Ces auteurs ont ainsi montré que la conformation du chitosane peut être décrite par une loi universelle qui dépend de la densité de charge du polymère. Cette loi met en évidence trois domaines de comportements bien distincts :

- $DA < 25\%$  : la chaîne est fortement chargée et présente un comportement polyélectrolyte décrit par la théorie de condensation de Manning<sup>18</sup>. La chaîne est expansée due à un effet de volume exclu électrostatique important.
- $25\% < DA < 50\%$  : domaine de transition puisque la chaîne est moyennement chargée.
- $DA > 50\%$  : la chaîne est faiblement chargée. Le taux élevé de groupements acétyle sur la chaîne provoque la formation de domaines hydrophobes. Les interactions polymère/polymère sont alors favorisées au détriment des interactions polymères/solvant, ce qui conduit à la déplétion des chaînes.



**Figure 11.** Variation de la viscosité et de la constante de Huggins avec le  $DA$  du chitosane en solution aqueuse (tampon acide acétique/ acétate d'ammonium  $\mu = 0.15$ )<sup>89</sup>.

Les différents domaines observés sur la Fig. 11 ont aussi été observés par Lamarque et al.<sup>85</sup> en faisant varier le DPw du polymère :

- DPw < 1300 :  $DA < 25\%$  : la chaîne est flexible.  $25\% < DA < 50\%$  zone de transition, accompagnée d'une augmentation de la rigidité de la chaîne.  $DA > 50\%$  la contribution stérique favorise la rigidité des chaînes. L'hydrophobie entraîne l'agrégation de certaines chaînes.
- DPw > 1 800 : la longueur de persistance augmente de 4 à 10 nm avec le  $DA$ .

Il a aussi été remarqué que la structure conformationnelle du chitosane dépendrait d'autres facteurs tels que la température, le pH et la force ionique<sup>90</sup>. L'ajout d'un sel dans une solution de chitosane a pour effet d'écranter les interactions répulsives, ce qui conduit à une structure plus compacte, rigide<sup>90-92</sup>. Les mesures de viscosité du chitosane en présence d'acétate de sodium effectuée par Chattopadhyay et al.<sup>75</sup> montrent clairement la diminution de la viscosité relative avec la force ionique. L'écrantage des charges du macroion engendre une faible résistance à l'écoulement.

Les résultats de la littérature concernant le comportement en solution du chitosane sont assez dispersés. On peut attribuer cette différence à la diversité des conditions d'analyse (solvant, concentration, force ionique etc) et au manque de contrôle des paramètres structuraux des échantillons analysés ( $DA$ ,  $M_w$  et  $I_p$ ). En cela, les études conduites par Lamarque et al ; ainsi que Schatz et al. sont les plus abouties et les plus précises car elles prennent en compte un très grand nombre d'échantillons à structure macromoléculaire contrôlée, à faible  $I_p$ , et une très large gamme de  $DA$ .

### ***1.3 Préparation d'une série homogène d'échantillons de chitosane***

Pour éviter toute disparité des résultats expérimentaux, nous avons choisi un chitosane de départ de faible  $DA$ , et haute masse molaire moyenne, à partir duquel nous avons préparé plusieurs séries homogènes d'échantillons avec des paramètres variables : le degré d'acétylation et la masse molaire.



### 1.3.1 N-acétylation

La N-acétylation consiste à faire réagir le chitosane avec de l'anhydride acétique dans le but d'obtenir un degré d'acétylation des fonctions amine supérieur à celui de départ. La réaction se déroule généralement dans des conditions homogènes<sup>69,93</sup>. La méthode utilisée au cours de nos travaux a été mise au point par Vachoud et al<sup>94</sup> qui utilise le 1,2 propanediol, comme solvant, ce qui permet de mieux contrôler la réaction grâce à sa viscosité élevée et de minimiser l'acétylation des fonctions hydroxyle du polymère. Contrairement à la désacétylation, cette réaction est conduite à température ambiante, limitant ainsi la dégradation des chaînes polymères. L'intérêt de cette réaction réside aussi dans le fait qu'elle donne des chitosanes à distribution statistique.

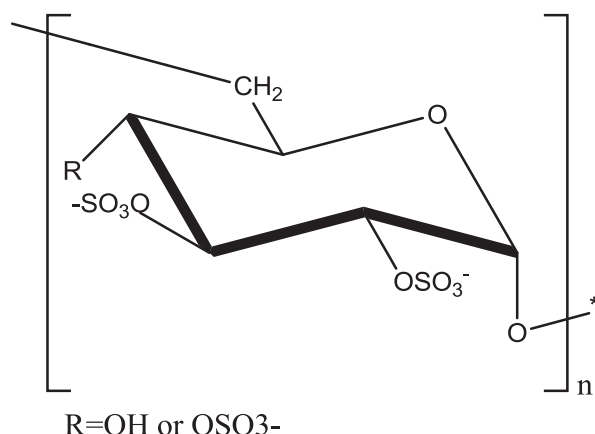
### 1.3.2 Dépolymérisation

La dépolymérisation du chitosane peut s'effectuer par plusieurs méthode : enzymatique<sup>95-97</sup>, physique<sup>98,99</sup> ou encore chimique<sup>100-102</sup>. Cette dernière est la plus couramment utilisée puisqu'elle présente l'avantage d'être rapide, simple à mettre en œuvre et réalisable à des volumes plus importants. La méthode que nous avons choisie appartient à la voie chimique. Développée par Allan et Peyron<sup>100,102</sup>, elle consiste à hydrolyser le polymère par désamination nitreuse en présence de nitrite de sodium. Cette technique nécessite une étude cinétique préalable pour déterminer le temps de réaction nécessaire à l'obtention de la masse moléculaire souhaitée.

## 2. Le sulfate de dextrane

### 2.1 Définition, origine et structure

Le sulfate de dextrane est un polysaccharide ramifié<sup>103,104</sup> obtenu industriellement par la fermentation du dextrane<sup>105,106</sup>, polymère naturel synthétisé par certaines bactéries (leuconostoc, streptococcus) à partir du saccharose<sup>107</sup>. Le nombre et la taille des branchements ne sont actuellement pas connus. Ils dépendent des bactéries utilisées pour la synthèse du dextrane à partir duquel est synthétisé le sulfate de dextrane. Toutefois, de manière générale, ce degré de branchement reste faible<sup>108</sup>.



**Figure 12.** Structure chimique du sulfate de dextrane

Il contient approximativement 17% de groupement sulfate, ce qui correspond en moyenne à 2.3 d'ions sulfate par résidu glucose<sup>105,107</sup> (Fig. 12).

Ce polymère est biodégradable, biocompatible et a des propriétés similaires à l'héparine<sup>106,109</sup>. Sa capacité à s'ioniser en solution aqueuse, rend ce polyanion intéressant pour l'industrie pharmaceutique. Il est notamment utilisé comme vecteur pour la libération contrôlée de molécules actives<sup>103,104,110</sup>.

## 2.2 Conformation en solution

Très peu d'études rapportent le comportement en solution du sulfate de dextrane. Quelques travaux en ce sens montrent que la structure ramifiée de la macromolécule augmente les interactions intra et intermoléculaires. En solution, le sulfate de dextrane a tendance à adopter une conformation en spirale<sup>111</sup>. Cette organisation est fortement influencée par la température et la concentration en polymère.

Kijewska et al.<sup>112</sup> reportent que le comportement du sulfate de dextrane en solution d'électrolyte n'obéit pas à la théorie de Manning. La structure particulière du polymère à la fois souple et sphérique induit la répartition des charges à la surface et à l'intérieur de la sphère. Le solvant ne peut pénétrer profondément la macromolécule. De fait la permittivité à

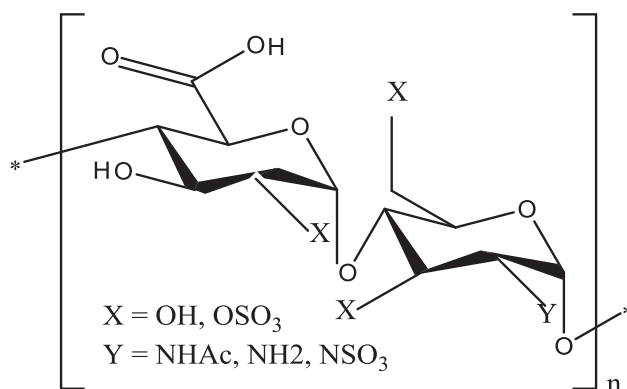
l'intérieur et à l'intérieur de la sphère peut être remarquablement différente par rapport à celle du solvant.

### 3. L'héparine

#### 3.1 Définition, origine et structure

L'héparine est un mélange complexe de mucopolysaccharides, naturellement produit par les cellules mastocytaires de la cavité péritonéale et des poumons<sup>113-118</sup>. Elle est constituée de longues chaînes linéaires, richement sulfatées, composée d'unités D-glucosamine (GlcN), d'acide iduronique (IdoA) et d'acide glucuronique (GlcA)<sup>113,117</sup> (Fig. 13). L'héparine commerciale est principalement extraite des muqueuses d'intestin de porc ou de poumon de bœuf<sup>119</sup>. Cependant, pour des raisons sanitaires, cette dernière source est prohibée depuis plusieurs années afin de prévenir toutes contaminations virales ou problèmes liés aux prions.

Les héparines standards, obtenues par extraction sont qualifiées de non fractionnée (HNF) et possèdent une masse moléculaire comprise entre 3 000 et 30 000 g.mol<sup>-1</sup>. La dépolymérisation chimique<sup>119-121</sup> (hydrolyse à l'acide nitrique ou alcaline), enzymatique<sup>122,123</sup> (héparinase) ou physique<sup>124,125</sup> (ultrasonification ou irradiation) permet de produire des héparines à faible poids moléculaire, appelées HBPM. Selon les exigences de la pharmacopée européenne, les HBPM devraient posséder une masse moléculaire inférieure à 8 000 g.mol<sup>-1</sup>.



**Figure 13.** Structure chimique de l'héparine

Cette macromolécule est très hétérogène tant en ce qui concerne sa masse moléculaire, sa polydispersité que sa composition chimique. Cette hétérogénéité est fonctionnelle puisque les différentes fractions d'héparine ont une activité biologique différente<sup>126</sup>. Toutefois, les HBPM sont plus homogènes, en particulier celles dites de très basse masse molaire (UHBPM). Leur biodisponibilité peut être six fois plus importante que celle des HNF.

L'héparine est l'anticoagulant<sup>116,117,127-129</sup> le plus utilisé dans le monde depuis 70 ans. Elle peut être administrée par injection parentérale, intraveineuse ou sous-cutanée, sans altérer son activité biologique qui par ailleurs demeure encore non élucidée. Cependant, aujourd'hui tout le monde s'accorde à dire que l'héparine induit son effet pharmacologique en se fixant à l'antithrombine III, une protéine plasmatique, synthétisée par le foie, responsable de la régulation de la coagulation. L'héparine peut aussi exercer son activité biologique par de nombreux autres mécanismes : inhibition de la fixation des sérine-protéases sur les phospholipides, action sur les plaquettes, libération de la lipoprotéine lipase de l'endothélium vasculaire, etc.

Néanmoins son utilisation n'est pas sans risque, étant d'origine animale, l'héparine peut être facilement contaminée et induire des complications voire des décès chez les patients<sup>130</sup>. Ce cas de figure, a été observé en 2008, suite à la contamination de lots d'héparine chinoise qui a entraîné près de 80 décès et pratiquement autant de cas d'allergie aggravée. La solution actuelle pour sécuriser la fabrication industrielle de cette macromolécule est de s'affranchir des produits animaux et favoriser la formulation de produits entièrement synthétiques. De nombreux travaux en ce sens se sont développés ces dernières années. Deux voies de synthèse ont alors vu le jour : la synthèse chimique<sup>131-133</sup> et la synthèse chimio enzymatique. La synthèse chimique permet de préparer des produits homogènes possédant des propriétés pharmacologiques parfaitement contrôlées et reproductibles. Les produits de départ de ces synthèses sont souvent des oligosaccharides D-glucosamide et acide D-glucuronique sur lesquelles est ajoutée une fonction sulfate. Cette synthèse exige plusieurs étapes de protection et de déprotection des sites fonctionnalisables du monosaccharide de départ. Cette mode de synthèse est donc très longue et nécessite en plus des étapes de purification. Le rendement est de plus très faible, seulement 0.1% dans le cas du Fondaparinux après 50 étapes de préparation. La complexité structurale et la taille de l'héparine rendent donc toute synthèse chimique coûteuse et difficile. Ces faits constituent aujourd'hui un frein majeur à l'exploitation industrielle de cette voie.

La deuxième technique est chimio enzymatique. Cette dernière est un procédé biotechnologique<sup>114,132,134–136</sup> utilisant des enzymes capables de reconstituer un à un les éléments structuraux de l'héparine. Ce qui assure la possibilité d'un contrôle à chaque étape de production. Xu et al ont ainsi obtenu un oligosaccharide comportant un minimum de 19 résidus O-sulfate le long de la chaîne pour induire une activité inhibiteur du cofacteur II-a<sup>136</sup>. Un résidu de 21 O-sulfate affiche une pleine inhibition et donc une activité coagulante comparable à l'héparine de base. Malgré ces résultats prometteurs, la quantité d'héparine produite par ce biais reste pour l'heure symbolique. La production industrielle devrait encore attendre son optimisation pour pouvoir passer les tests cliniques exigés pour tous nouveaux médicaments.

### **3.2 Conformation en solution**

Dans le cas de l'héparine, sa structure complexe complique relativement l'interprétation des résultats expérimentaux sur sa structure en solution. La RMN et la diffusion des rayons X sont les principales méthodes utilisées pour étudier sa conformation<sup>137,138</sup>. De ces études, Povlov et al.<sup>138</sup> ont montré que le noyau pyranose des résidus GlcA et GlcN sont rigides tandis que les résidus IdoA sont plus flexibles. Ceci explique probablement en partie la capacité remarquable de l'héparine à se lier à une large gamme de macromolécules de charge opposée (protéines, polyélectrolytes). Toutefois, de manière générale, il a été reporté que l'héparine en solution adopte une structure semi-rigide, sa longueur des segments varie entre 7 et 12 nm<sup>137</sup>.

### **Conclusion**

Les résultats de la littérature sur la solubilité et la conformation en solution des polysaccharides et plus particulièrement du chitosane a permis de mettre en évidence l'utilité de travailler avec des série homogènes d'échantillons de faibles polydispersité. Malgré la multiplicité des travaux sur ces polymères, il existe très peu d'information sur leur comportement en présence d'électrolyte tel que le NaCl. L'approfondissement de cet aspect sera donc une source d'information supplémentaire dans la compréhension du comportement en solution de ces polysaccharides.

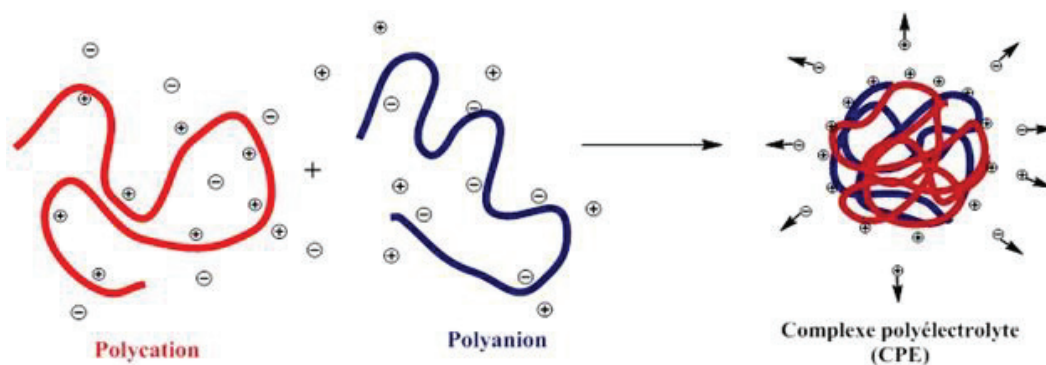
Les polysaccharides considérés ici peuvent s'ioniser en solution, ils constituent donc de bons candidats à la formation de complexes polyélectrolytes. Les polysaccharides sont connus pour la flexibilité limitée de leur chaîne à cause de la structure cyclique des unités de répétition et de liaison glycosidique. Néanmoins, les polysaccharides sont très couramment utilisés dans ce domaine d'application.

### **III. Les complexes polyélectrolytes à base de polysaccharides**

Après avoir présenté les composants de notre étude pris individuellement et leurs principales caractéristiques, nous aborderons dans les paragraphes qui vont suivre la formation de complexes électrostatiques entre polyions. Cette technologie a suscité, et continue encore, un grand intérêt dans la communauté scientifique et plusieurs revues ont été publiées sur l'association du chitosane avec le sulfate de dextrane<sup>139,140</sup> ou l'héparine<sup>141,142</sup>. Dans ce troisième chapitre, nous résumerons les principales informations, concernant notamment le mécanisme d'assemblage, les paramètres qui influencent l'association et la stabilité des systèmes, et enfin les organisations structurales des objets observés.

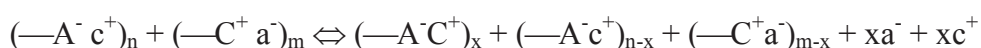
#### **1. Mécanisme d'assemblage des complexes polyélectrolytes**

La formation de complexes polyélectrolytes (CPEs) résulte d'interactions électrostatiques attractives entre un polyanion et un polycation en solution aqueuse (Fig. 14). A de très faibles concentrations en sel, la réaction est essentiellement contrôlée par le gain entropique lié à la libération des contreions initialement associés aux macromolécules. D'autres interactions secondaires telles que les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et de van der Waals complètent la formation des CPEs et participent au maintien de la stabilité du système.



**Figure 14.** Représentation schématique de la libération des contreions lors de l'association de deux polyélectrolytes de charges opposées.

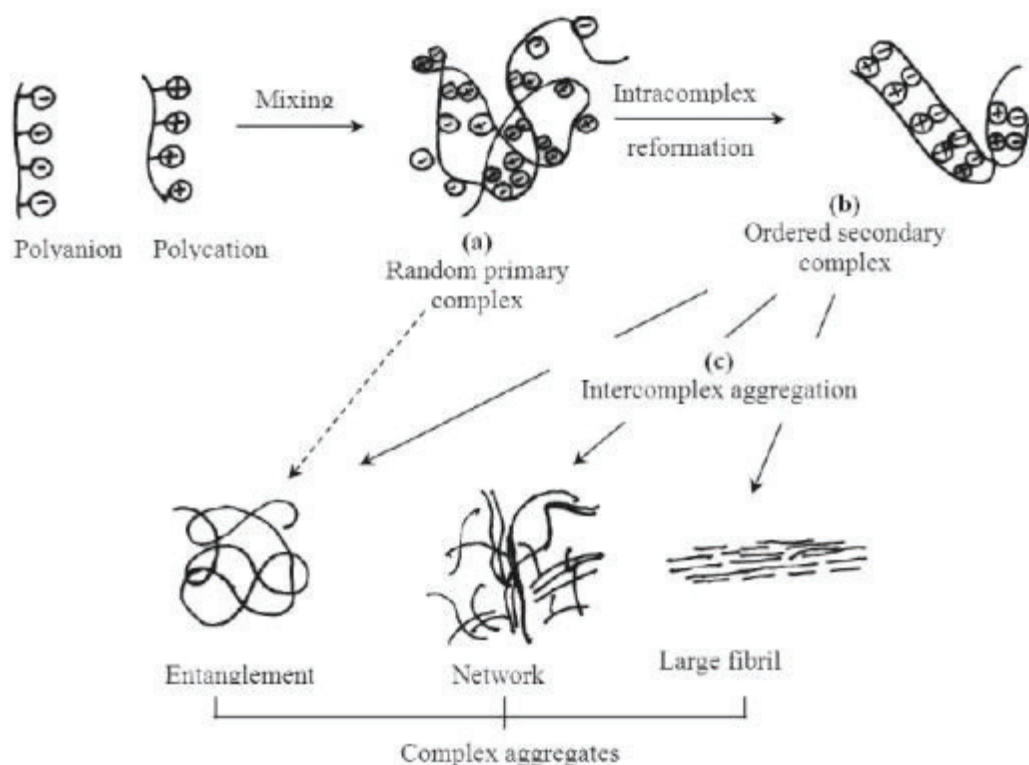
La réaction de complexation polyélectrolyte peut être représentée par l'équation suivante<sup>143</sup> :



$A^-$  représente le polyanion,  $C^+$  le polycation,  $a^-$ ,  $c^+$  les contreions, et  $n$ ,  $m$  le nombre de groupe anionique et cationique en solution. A partir de ce dernier, d'autres grandeurs sont introduites pour décrire la réaction de complexation :

- Le rapport molaire de mélange,  $X$  avec  $X = n/m$  ou  $X = m/n$
- Le degré de conversion  $\theta$ , lié à la libération des contreions :  $\theta = x/n$ , avec  $n < m$  ou  $\theta = x/m$  avec  $m < n$ . Le taux de conversion détermine si les sites ioniques des macroions sont complètement liés au polyélectrolyte de charges opposées ou si des contreions restent en partie dans le complexe.

La formation des CPEs peut être aussi décrite comme un mécanisme en trois étapes<sup>144</sup> (Fig. 15). La première est instantanée et conduit à la formation d'un complexe primaire de type agrégats dans lesquels les chaînes polyélectrolytes adoptent un arrangement aléatoire qui peut être métastable et dont l'évolution conduirait à un complexe secondaire par la formation de nouvelles interactions électrostatiques, liaison hydrogène ou interaction hydrophobe etc. Sous certaines conditions, les complexes primaires et secondaires peuvent subir des réarrangements structuraux suite à des échanges entre chaînes polyélectrolytes ou le milieu de conservation pour ainsi former divers structures stables de types agrégats enchevêtrés, réseaux ordonnés, fibres etc.



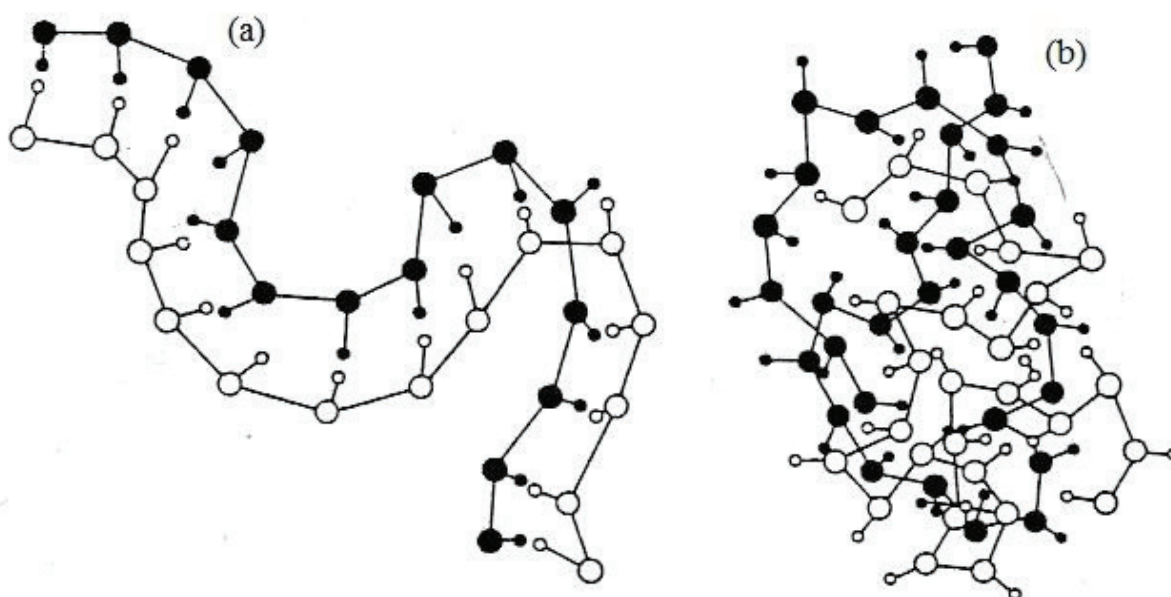
**Figure 15.** Représentation schématique des étapes de formation des complexes polyélectrolytes<sup>144</sup>.

A l'issue des réorganisations de chaînes, les CPEs peuvent présenter des structures très différentes (Fig. 16) selon les caractéristiques initiales des polyélectrolytes (densité de charges, ou conformation) et les conditions expérimentales (nature du solvant, force ionique, pH, concentration en polymère, etc.). Deux structures modèles sont répertoriées dans la littérature<sup>143</sup>:

- Le modèle en forme d'échelle, correspond selon Michael et al<sup>145</sup> à un complexe parfaitement régulier, formé suite à un réarrangement conformationnel des chaînes. La réaction de complexation se produit de site chargé en site chargé par un mécanisme de type « zip » par analogie avec une fermeture éclair.
- Le modèle dit en « oeufs brouillés » (scrambled egg) est obtenu après complexation aléatoire entre les deux polyélectrolytes. Dans ce cas, les chaînes sont très enchevêtrées ce qui rend tout réarrangement impossible. L'utilisation de



polyélectrolytes de masse molaire élevée ou de forte concentration favorise la formation de ce genre de structure.



**Figure 16.** Structure des complexes polyélectrolytes : modèle (a) en échelle et (b) de type « œufs brouillés ».

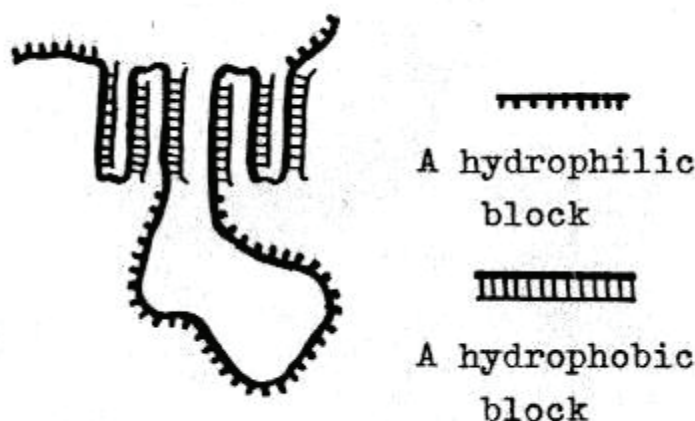
La modulation des paramètres intrinsèques ou extrinsèques aux polyélectrolytes conduit par ailleurs à la formation de complexes macroscopiquement différents dont quelques exemples seront détaillés ultérieurement :

- Les complexes solubles dans l'eau sous forme d'une seule phase homogène
- Les complexes agrégés à l'état colloïdal
- Les complexes hydrogels

## 2. Les complexes polyélectrolytes solubles dans l'eau

Kabanov<sup>146-148</sup> et Tsuchida<sup>149-151</sup> ont été les premiers à étudier la formation et la stabilité des complexes solubles dans l'eau. Selon ces auteurs, le procédé est non stœchiométrique et fait intervenir des macroions de faibles densités de charge et de masses moléculaires très différentes. Le macroion de forte masse moléculaire appelé « hôte » (host,

HPE) est pris en excès par rapport à celui de faible masse appelé « invité » (guest, GPE). Les complexes ainsi formés sont thermodynamiquement stables et présentent une structure en échelle avec des segments hydrophile et des segments hydrophobes (Fig. 17) qui correspondent à une distribution uniforme du macroion de faible masse molaire le long des chaînes polyélectrolytes de forte masse moléculaire.



**Figure 17.** Représentation schématique d'une séquence d'un complexe soluble<sup>146</sup>

Comme décrit par Kabanov et al.<sup>146</sup>, ces systèmes sont très sensibles à l'ajout d'électrolyte. L'ajout d'une petite quantité de sel dans le milieu provoque un réarrangement des chaînes, qui donne lieu à la formation d'un complexe proche de l'équilibre thermodynamique. L'augmentation de la concentration en sel ajouté induit la rétraction du complexe due à l'écrantage des charges. L'ajout de sel supérieur à une concentration critique entraîne la précipitation, puis la dissolution des espèces. Les deux polyélectrolytes se retrouvent ainsi libres en solution comme avant la réaction de complexation. Ce phénomène montre le caractère réversible du processus.

### 3. Les complexes polyélectrolytes colloïdaux

Les complexes fortement agrégés peuvent aussi se présenter sous forme de suspension de particules. Ces dernières sont d'apparence sphérique<sup>152,153</sup> et de structure amorphe<sup>154</sup>. Les modes d'introduction d'une solution dans l'autre (goutte-à-goutte ou en une seule fois), la vitesse d'agitation,<sup>155</sup> la nature des polyélectrolytes (fort/faible), leur ratio de charge ( $n^+/n^-$ )<sup>154</sup>, l'ajout de sel, le pH ainsi que les mélanges de différentes longueurs de chaîne, de degré de

polymérisation<sup>156-158</sup> sont autant de paramètres qui permettent d'obtenir des complexes de morphologies, caractéristiques et stabilité bien différentes.

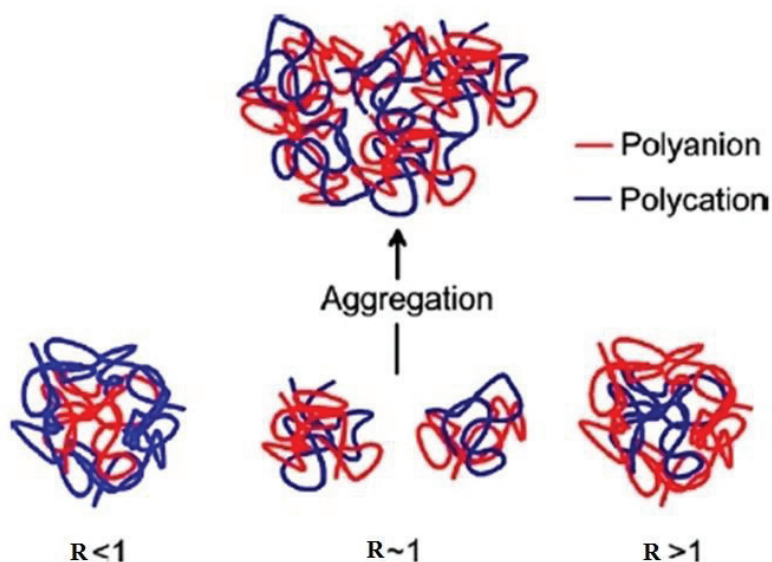
### *3.1 Effets des paramètres intrinsèques des polyélectrolytes*

Les paramètres intrinsèques correspondent au degré d'acétylation, à la longueur de la chaîne chitosane et au ratio de charge ( $n^+/n^-$ ) entre les deux polyélectrolytes. Schatz et al.<sup>156,159</sup> ont étudié les effets du *DA* et de la masse molaire du chitosane sur la taille des particules chitosane/sulfate de dextrane. Ainsi, plusieurs échantillons de chitosane avec une très large gamme de masses molaire, comprise entre 13 000 et 350 000 g.mol<sup>-1</sup> et des *DAs* entre 1 et 71% ont été préparés. Les sulfate de dextrane utilisés avaient eux aussi des masses molaire variables, 5 000, 10 000 et 1 500 000 g.mol<sup>-1</sup>. Dans ces conditions, la complexation entre ces deux espèces a permis de mettre en évidence l'importance des paramètres intrinsèques du chitosane sur la taille des particules. En effet, un accroissement de la masse molaire conduit à une augmentation des tailles - de 200 nm pour  $M_w = 15\,000$  g.mol<sup>-1</sup> à 1  $\mu$ m pour  $M_w = 350\,000$  g.mol<sup>-1</sup> - et ce quel que soit le degré d'acétylation et la masse molaire du sulfate de dextrane. De même, pour une masse molaire de chitosane fixée à 130 000 g.mol<sup>-1</sup>, une augmentation du *DA* engendre un accroissement des tailles<sup>159</sup>.

La formation de particules par complexation de polyélectrolyte peut être détectée par l'effet Tyndall. Ce dernier se produit très vite, même en présence d'une très faible quantité de polyanion. Dans le cas du chitosane associé au sulfate de dextrane, il se produit dès un ratio ( $n^+/n^-$ ) équivalent à 20<sup>140</sup>. L'ajout d'un volume plus important de sulfate dextrane accentue la turbidité du mélange suite à la formation de nouvelles particules. Ce phénomène suggère que la complexation de polyélectrolyte est un processus cinétiquement contrôlé grâce à la différence de  $pK_0$  des deux polyélectrolytes et au ratio de mélange.

Des études de diffusion de rayonnement ont montré qu'en cas d'excès de l'un des deux macroions, la forme sphérique des particules est de type cœur-couronne, avec un cœur neutre, du point de vue des charges, et une couronne stabilisante composée du macroion en excès<sup>143</sup>. Par conséquent, un excès de polycation donne lieu à la formation d'une particule chargée positivement et réciproquement, un excès de polyanion engendrera la formation de particules chargée négativement<sup>140,155</sup>. De manière générale, les particules ont des tailles

submicroniques. En revanche, pour un rapport de charge ( $n^+/n^-$ ) égale à 1, la formation d'un objet de charges neutres est attendue. L'obtention d'objets sous forme d'agrégats voire de précipitations n'est toutefois pas à exclure<sup>155</sup> (Fig.18).



**Figure 18.** Illustration schématique de la structure des complexes colloïdale en fonction du ratio de charge ( $n^+/n^-$ )<sup>155</sup>.

L'effet du rapport de charge sur la taille des particules chitosane/sulfate de dextrane et chitosane/héparine ont été respectivement étudié par Schatz et al.<sup>159</sup> et Boddohi et al.<sup>142</sup>. Lors de l'utilisation du sulfate de dextrane comme polyanion, une diminution de la taille des particules est observée avec la diminution du rapport de mélange ( $n^+/n^-$ ) jusqu'à 2. Au-delà de cette valeur, c'est-à-dire à ( $2 < (n^+/n^-) < 1$ ), un accroissement des tailles est observé. Ces auteurs ont par ailleurs reporté l'impossibilité de former des particules pour un rapport de mélange égale à 1 à cause de la présence de forte précipitation.

Il a aussi été montré que la réaction de complexation est différente selon la charge surfacique des particules formées. Lors d'un excès de polyanion, les particules les plus stables sont formées avec un sulfate de dextrane de masse molaire égale à 500 000 g.mol<sup>-1</sup>. Une masse molaire de 5 000 g.mol<sup>-1</sup> conduit à un système floculé pour tous les chitosanes testés. Dans le cas des particules positives, les floculations sont observées pour des rapports de charges éloignés de la neutralité soit proche de 0,5-0,6.

Dans le cas de l'héparine, les mêmes effets du ratio de charge sur la taille des particules ont été observés : de petites tailles pour des ratios de charge inférieurs à 1 et une augmentation des tailles à l'approche d'un ratio de 1. A partir de  $n^+/n^- = 0.78$ , la formation de particule est impossible due, selon les auteurs, à la réduction de la stabilité colloïdale engendré par la diminution de la charge nette à la surface des particules<sup>142</sup>.

En résumé, les propriétés des solutions de polyélectrolytes conditionnent la neutralisation mutuelle des charges des deux polyélectrolytes. Une forte neutralisation des charges induit la formation d'objets de petites tailles. En revanche, lorsque la neutralisation des charges est maximale, les particules flocculent à cause d'un défaut de stabilisation électrostatique. Ceci est vrai dans le cas des rapports de charges proche de 1 ou lors de la complexation d'un chitosane de haute masse molaire avec un excès de sulfate de dextrane de faible masse molaire<sup>140</sup>.

### *3.2 Effets des conditions expérimentales*

Les associations entre les macroions de charges opposées résultent des interactions électrostatiques entre les sites ionisés accessibles le long des chaînes macromoléculaires<sup>160,161</sup>. Les paramètres expérimentaux capables d'influer sur ces interactions engendrent des modifications non négligeables sur la structure même des complexes. L'ajout de sel<sup>162</sup>, l'augmentation de la concentration en polymère<sup>159</sup> ou la modification du pH de la dispersion<sup>163</sup> sont donc autant de paramètres qui ont leur importance lors de l'élaboration de ces objets.

L'ajout de sel dans une solution de polyélectrolyte réduit l'intensité des interactions électrostatiques et engendre la réorganisation des chaînes<sup>164,165</sup>. L'effet de ce paramètre sur la structure des colloïdes diffère selon le mode d'introduction, la concentration ajoutée et les caractéristiques des polyélectrolytes de départ. Une faible quantité de sel ajouté lors de la formation des complexes colloïdaux, diminue la taille ainsi que la polydispersité des particules de manière spectaculaire. La diminution des interactions électrostatiques par le sel, induit une plus grande flexibilité des chaînes macromolécules, favorisant ainsi une conformation adéquate à une complexation plus efficace<sup>140,166</sup>. A une concentration en sel ajouté plus élevée, les particules forment des agrégats de complexes. Ceci résulte d'une

déstabilisation des complexes primaires par écrantage des charges. Les agrégats formés sont donc des agrégats secondaires qui ont des diamètres hydrodynamique plus larges<sup>143</sup>.

Enfin, la présence d'un excès de sel diminue le gain entropique lié à la libération des contreions associés aux polyélectrolytes. Plus la salinité est élevée, plus l'écrantage des charges est marqué, ce qui se traduit par le déplacement de l'équilibre de la réaction dans le sens de la dissociation des complexes. Le sel abaisse donc la densité de charge apparente des chaînes polyélectrolytes ce qui conduit à la diminution du potentiel électrostatique de ces mêmes chaînes pour favoriser, selon le système et les conditions de travail, leur dissociation ou leur floculation<sup>156,167</sup>.

Lorsque l'addition de sel a lieu après formation des particules, plusieurs observations sont reportées dans la littérature selon le type de macroions utilisés. Dans le cas des polyélectrolytes forts, le système subit une agrégation secondaire conduisant à la floculation du système. La forte diminution - avec l'augmentation de la salinité - de la longueur de Debye de la chaîne polyélectrolyte entourant la particule en est la cause<sup>143</sup>. Cette déstabilisation s'accroît lorsque le rapport de mélange ( $n^+/n^-$ ) s'approche de 1. En revanche, pour les systèmes composés d'un ou de plusieurs polyélectrolytes faibles, le gonflement des particules a été observé en premier lieu, suivi de leur dissociation avec l'augmentation de la salinité. La densité de charge est un paramètre clé pour ces composés puisqu'elle participe à la stabilité du système<sup>143</sup>.

Une augmentation de la concentration en polymère, lors de l'élaboration des complexes colloïdaux, engendre un accroissement de la taille des particules<sup>159,166,168</sup>, résultant d'un accroissement du nombre de chaînes macromoléculaires auto-assemblées. La formation de particules de taille colloïdale requiert donc des conditions très diluées. La concentration optimale de 0,1% dans le cas du sulfate de dextrane<sup>159,169</sup> et de l'héparine<sup>142</sup> a été reportée dans la littérature. A partir de particules chitosane-héparine, Liu et al.<sup>170</sup> ont observé une diminution du taux de solide avec l'accroissement de la concentration en chitosane, polymère utilisé en excès. Cela suggère donc que le mécanisme de complexation est limité par le polymère en défaut. En revanche, lorsque le rapport de mélange est maintenu constant, l'augmentation de la concentration des deux polyélectrolytes permet à la fois l'augmentation de taille des particules et du taux de solide.

Le mode d'addition (goutte à goutte ou direct) et l'ordre d'ajout (polyanion dans le polycation ou inversement) des réactifs jouent aussi un rôle primordial sur les caractéristiques des objets formés. Lors de l'ajout goutte à goutte d'une solution dans l'autre, l'ordre de mélange est essentiel. Le polymère en défaut doit être ajouté dans la solution de polymère en excès de manière à éviter la formation d'agrégats<sup>140</sup>. Malgré ces précautions, les systèmes chitosane-sulfate de dextrane se regroupent irréversiblement en agrégat lorsque le ratio de charge ( $n^+/n^-$ ) atteint l'unité<sup>140</sup>, ce qui va à l'encontre de ce qui a été rapporté dans le cas des polymères synthétiques<sup>168</sup>. Inversement, le mélange en « one-shot » des deux polyélectrolytes est insensible à l'ordre d'addition, ce qui confirme le caractère cinétiquement contrôlé du procédé. Ainsi, une méthode très simple basée sur l'addition rapide du sulfate de dextrane dans une solution de chitosane à tous ratios de charge a été développée par Schatz et al.<sup>156,159</sup>.

Les complexes colloïdaux peuvent être sensibles au pH<sup>171</sup>. Dans le cas des particules chitosane-sulfate de dextrane, Schatz et al.<sup>159</sup> ont constaté une diminution du diamètre hydrodynamique des particules avec l'augmentation du pH. La neutralisation des unités glucosamines protonées provoque la diminution de l'épaisseur de la couronne et donc la taille des particules. Cette observation est cohérente avec le fait que les particules sont constituées d'un noyau hydrophobe, et d'une couronne chargée riche en chitosane. Dans certains cas, la modification du pH provoque la libération d'un actif encapsulé. Ce phénomène fait suite à la diminution de l'association électrostatique entre polyélectrolytes<sup>164</sup> après la neutralisation des groupements chargés.

Enfin, de manière générale, la vitesse d'agitation n'a pas d'impact sur les caractéristiques des particules obtenues<sup>169</sup>.

### ***3.3 Stabilité des complexes colloïdaux***

Un autre aspect intéressant dans l'étude des particules est l'impact de sa composition sur la stabilité colloïdale. L'étude de cette dernière est en effet primordiale puisque la détermination de la performance des particules à transporter des molécules actives en dépend. Weber et al.<sup>172</sup> ont étudié la stabilité en milieu physiologique (NaCl à 150 mM) de particules obtenues à partir de chitosanes aux degrés d'acétylation et masses molaires variables<sup>172</sup> et un sulfate de dextrane de masse molaire égale à  $10^4$  g mol<sup>-1</sup> et  $10^6$  g mol<sup>-1</sup>. En présence de



150 mM de sel, les particules obtenues à partir d'échantillons de chitosane aux *DAs* inférieurs à 30 % s'agregent instantanément. Comme la stabilité colloïdale est principalement reliée aux forces électrostatiques répulsives, les auteurs de cette étude attribuent cette instabilité au comportement en solution du chitosane, qui, à des *DAs* < 30% se comporte comme un polyélectrolyte fort avec une densité de charge élevée<sup>85,89</sup>. Pour des *DAs* égaux ou supérieurs à 30 %, la cinétique d'agregation des colloïdales dépend du degré d'acétylation et du degré de polymérisation des deux polymères. La stabilité colloïdale optimale en milieu physiologique est obtenue pour un chitosane avec un *DA* de 51%, et une masse molaire de 150 000 g.mol<sup>-1</sup> et un sulfate de dextrane de 10 000 g.mol<sup>-1</sup>. Pour un *DA* égal à 70%, une mauvaise stabilisation a été observée, conséquence d'un caractère hydrophobe accru du chitosane à ce *DA*.

### ***3.4 Applications biomédicales des complexes colloïdaux***

Les complexes colloïdaux à base de polysaccharides sont admis par la pharmacopée de part la biocompatibilité des matériaux et les conditions de formulation. Ces particules constituent ainsi des candidats idéaux pour le transport de molécules actives dans le cadre d'une application pharmaceutique ou en thérapie génique, d'autant que les conditions de formulation très douces permettent d'encapsuler des molécules biologiques fragiles, tout en préservant leur intégrité et leurs propriétés<sup>173-178</sup>. Nous illustrerons dans la partie qui va suivre l'utilisation des complexes colloïdaux dans le domaine de la délivrance de principes actifs.

Liu et al.<sup>170</sup> ont utilisé des particules chitosane-héparine de charges positives comme modèle de vecteurs de protéines. Pour cela, la BSA (albumine de sérum bovin) a été prise comme modèle et a été pré-complexée au chitosane avant d'ajouter la solution d'héparine. Ainsi, ces auteurs ont constaté que le taux de solide influence énormément le rendement d'encapsulation. Une concentration élevée en polyélectrolytes induit un taux de solide élevé et par conséquent un meilleur taux d'encapsulation de la BSA. Selon les conditions expérimentales, le rendement obtenu par cette équipe varie entre 10 et 55%.

Chen et al.<sup>179</sup> ont rapporté un taux d'encapsulation relativement élevé, d'un peptide anti-angiogénique dans des particules chitosane-sulfate de dextrane. Pour cette étude, les auteurs



ont mélangé le peptide dans une solution de sulfate de dextrane à 0,1%, qui, ensuite a été introduite dans une solution de chitosane de même concentration, avec un rapport de mélange (n+/n-) variable. Les particules contenant le peptide se forment immédiatement après mélange des deux solutions. Leurs caractéristiques physicochimiques et le profil de libération du peptide sont étroitement liés au rapport de mélange entre les deux polyélectrolytes. Ainsi, un ratio égale à 0,59 offre des résultats optimums avec des tailles inférieures à 300 nm, un taux d'incorporation maximal de 75% et une libération lente et continue du peptide sur une longue période d'au moins 6 jours.

De nombreux travaux reportent la complexation du chitosane avec l'ADN<sup>180,181</sup>, pour la délivrance de gènes. Celui réalisé par et Lavertu et al.<sup>182</sup> a permis de monter l'influence du degré d'acétylation, de la masse moléculaire du chitosane et du ratio de charge sur la capacité des particules chitosane-ADN à délivrer des gènes. Les nanoparticules formulées à partir de chitosane de faible masse moléculaire et un DA faible ( $DA= 2\%$ ,  $M_n = 120\,000\text{g.mol}^{-1}$ ) ont tendance à être instables, tandis que celles formulées à partir de chitosane de masse moléculaire élevée ( $M_n = 220\,000\text{g.mol}^{-1}$ ) et un  $DA$  de 28% sont plus stables mais l'expression des gènes est insuffisante. Des conditions intermédiaires mélangeant un haut  $DA$  avec une faible masse moléculaire et inversement permettent à la fois d'avoir une stabilité acceptable et une bonne expression des gènes à leur libération. Outre ce constat, les auteurs reportent des effets du rapport de charge et du pH sur l'expression des gènes. Les conditions optimales nécessitent donc de travailler à un pH de 6,5 et un rapport de charge égale à 5 pour le couple bas  $DA$ -haute masse moléculaire et un ratio de 10 pour l'inverse.

Les nombreux paramètres de formulation qui interviennent sur l'encapsulation de molécules comme les protéines compliquent la mise en place d'un protocole efficace. Une alternative à cela est l'adsorption de ces macromolécules biologiques à la surface des particules. La faisabilité de cette stratégie, pour une application vaccinale a été démontré par Drogoz et al.<sup>183</sup> et Weber et al.<sup>172</sup>.

La capacité de la technique de complexation à élaborer des particules modulables constitue un atout majeur pour cette application particulière. Le contrôle de la taille et des charges à la surface des particules se fait par la modulation de la concentration en polymère et du rapport de charge (n+/n-). Drogoz et al.<sup>183</sup> ont montré que la cinétique d'adsorption de la protéine p24 de la capsid du VIH-1 dépend de la nature des charges (positive ou négative) à la surface des

colloïdes. Moins de deux heures suffisent pour saturer la surface des particules négatives alors qu'il en faut vingt pour celles chargées positivement. La quantité maximale de protéines adsorbées par gramme de particules est de  $600 \text{ mg.g}^{-1}$  pour les particules positives et  $120 \text{ mg.g}^{-1}$  pour les négatives<sup>183</sup>. Les auteurs attribuent ces adsorptions élevées à une diffusion partielle de la protéine à l'intérieur des particules.

Les complexes colloïdaux peuvent aussi être utilisés comme vecteurs de molécules actives de petites masses molaires comme la doxorubicine<sup>175</sup>, l'amphotéricine B<sup>184</sup> ou le encore le ténofovir<sup>185</sup>. Pour de telles applications, la structure interne et la stabilité des colloïdes sont déterminantes pour assurer une bonne capacité à maintenir l'actif en son sein et d'assurer, par la suite, sa libération. Par exemple, Tan et al.<sup>186</sup> ont étudié l'encapsulation de la doxorubicine, un anticancéreux, et ont mis en évidence les effets des paramètres tels que la masse molaire et la concentration du sulfate de dextrane, la concentration en principe actif ainsi que le pH du milieu sur l'élaboration de microparticules. Le procédé expérimental consiste à pré-complexer la molécule active avec le chitosane, avant d'ajouter le sulfate de dextrane. Les résultats obtenus font état d'une efficacité d'incorporation de 99% pour une concentration en doxorubicine de 100 mM, un sulfate de dextrane avec une masse relative de  $8000 \text{ g.mol}^{-1}$ , une concentration de 150 mg/ml et un chitosane à 0,02%. Une approche similaire a été menée par Pollex et al.<sup>185</sup> pour l'encapsulation du ténofovir dans des particules chitosane-sulfate de dextrane. Ces auteurs ont obtenus un taux d'encapsulation de 99-100% avec 10 mg/mL de ténofovir et un rapport massique actif/chitosane de 0,3, 0,3 et 0,6. Ce rendement élevé n'a pas d'impact sur les tailles qui varient entre 530 et 560 nm. La capacité des nanovecteurs chitosane-ténofovir-sulfate de dextrane à adsorber des anticorps tout en maintenant la bioactivité de ces protéines a aussi été évaluée dans deux milieux différents : physiologique (PBS) et pH 5 (acide citrique). Les anticorps choisis sont des immunoglobulines A (IgA) anti-hCEA et anti- $\alpha 4\beta 7$ . Les résultats montrent une adsorption élevée de  $\sim 104 \text{ mg / g IgA / particules}$  à la fois dans le PBS et l'acide citrique pour les particules seules, sans actif. Cette adsorption diminue avec l'augmentation du rapport de masse ténofovir/chitosane. Des tests ELISA 'Enzyme-linked Immunosorbent Assays' (ELISA) ont montré que la capacité de reconnaissance des immunoglobulines était conservée au moins 7 jours. Les nanovecteurs à base de polysaccharides sont donc des bons candidats pour la délivrance ciblée de principes actifs.

#### 4. Les complexes polyélectrolytes hydrogels

Malgré de nombreux travaux sur les hydrogels<sup>187,188</sup>, aucune définition unique ne permet de les qualifier. Pour ce qui concerne les complexes hydrogels celle donnée par Peppas<sup>189–191</sup> peut être admise. Celui-ci définit un hydrogel comme un réseau constitué de chaînes polymères interconnectées et gonflées dans l'eau ou dans un fluide biologique.

Deux catégories principales de gels peuvent être identifiées selon la nature chimique ou physique des nœuds de réticulation; ainsi on parlera d'hydrogels chimiques et d'hydrogels physiques, respectivement. Dans le premier cas, les nœuds de réticulation sont des liaisons covalentes irréversibles. Les hydrogels physiques, sont quant à eux constitués de réseaux de chaînes polymères stabilisés par des liaisons hydrogène, interaction de van der Waals, ou ioniques. Ces liaisons sont considérés comme réversibles en fonction de la température et/ou du pH, de par leur faible énergie, qui selon Joanny et al.<sup>192</sup> est de l'ordre de  $k_B T$ .

##### 4.1 Structure et formation des complexes hydrogels

Comme les particules, les complexes hydrogels se forment suite à de fortes interactions électrostatiques entre deux polyélectrolytes de charges opposées. La gélification se fait par la formation de réseaux ioniques<sup>188</sup> entre les deux macroions. De cette manière, aucuns précurseurs organiques, ni catalyseurs ou agents ioniques ne sont utilisés. De plus, la réaction se déroule entièrement dans l'eau, ce qui évite de longues étapes de purification avant administration.

Berger et al.<sup>193</sup> rapportent que pendant la complexation, les polyélectrolytes peuvent coacerver ou former des hydrogels plus ou moins compacts. Lorsque les interactions ioniques entre les deux macroions sont trop fortes, une précipitation a lieu, comme dans le cas de l'héparine<sup>141</sup>, au détriment des hydrogels. Ceci est assez commun selon la nature du polyanion. Cependant, la précipitation peut être évitée par addition de sels, tel que le NaCl, qui diminue les interactions électrostatiques entre les chaînes polymères. Ce procédé a notamment été utilisé pour former des hydrogels de chitosane et carrageenane<sup>194</sup> ou de chitosane et de sulfate de dextrane.<sup>195</sup> Ceci leur a permis d'éviter la séparation de phase et donc d'obtenir un mélange visqueux et macroscopiquement homogène capable de se gélifier par diminution de la température.

La stabilité des systèmes hydrogels de CPEs est essentiellement régie par la flexibilité des chaînes polymères<sup>196</sup>, l'environnement de conservation et le degré d'interaction entre les deux polyélectrolytes. Il est possible de contrôler cet aspect par la maîtrise de la réaction de complexation<sup>196</sup> et ce en modulant le pH de la solution, la température, la concentration ionique<sup>197</sup>, ordre de mélange des macroions<sup>198</sup>, la taille des chaînes polymères, le ratio de charge (n+/n-) et la nature du solvant. La multitude de paramètres à contrôler constitue l'un des inconvénients majeurs de cette méthode. Ceci peut d'ailleurs être un frein à sa transposition industrielle<sup>188</sup>.

#### *4.2 Applications des complexes hydrogels*

Les complexes hydrogels sont utilisés dans de nombreux domaines, de l'industrie alimentaire<sup>199</sup> aux applications biomédicales<sup>188</sup>. Parmi ces dernières, le relargage contrôlé de principes actifs constitue un axe de recherche en pleine expansion. En effet, les complexes hydrogels se sont avérés d'excellents hôtes de molécules actives et permettent un relargage contrôlé dans le temps<sup>200,201</sup>. Les systèmes issus de la complexation du chitosane et de divers polyanions de types polysaccharides sont utilisés comme « bioréacteurs » pour la culture cellulaire<sup>202</sup>, ou encore dans le domaine de l'ingénierie tissulaire en tant que reconstituteurs de tissu<sup>203</sup> ou de la peau<sup>204</sup>.

### **Conclusion**

Les travaux présentés dans ce chapitre consacré à la complexation polyélectrolyte montrent l'intérêt de ce procédé dans l'élaboration de matériaux colloïdaux ou hydrogels à base de polysaccharides pour des applications biomédicales très variées. Respectueux de l'environnement, ce procédé n'utilise que l'eau comme milieu réactionnel, en l'absence de tout solvant organique ou réticulant chimique toxique. Simple à mettre en œuvre, elle consiste à mélanger à température ambiante et sous faible agitation, une solution de polyanion à une solution de polycation. La simplicité est un atout majeur de ce procédé, cependant pour une exploitation industrielle il faudra être capable de maîtriser les effets des divers paramètres intrinsèques et extrinsèques aux polyélectrolytes sur le système formé.

## Conclusion première partie

Dans cette première partie, nous avons vu que le comportement en solution des polyélectrolytes est assez complexe car les effets des interactions électrostatiques sont primordiaux. La modulation de ces interactions est réalisée en modifiant soit la densité de charges du polymère, soit la portée des interactions électrostatiques. Dans le premier cas, la densité de charge peut être altérée par modification du pH du milieu pour les groupements ionogènes ou par modification chimique, comme avec la réaction d'acétylation des fonctions amine ou l'estérification des acides carboxyliques. Dans le second cas, la portée des interactions électrostatiques peut être modulée par la force ionique du milieu ou la modification de sa constante diélectrique.

Les polyélectrolytes de charges opposées s'assemblent en milieux aqueux pour conduire à la formation de complexes polyélectrolytes. Cette association est instantanée car il est admis que la force motrice de cet assemblage est un gain d'entropie. Ainsi cette auto-association est un mode d'élaboration de matériaux très attractif car il requiert un faible apport énergétique, qu'il a lieu dans l'eau un solvant à faible impact écologique et que les matériaux sont formés en l'absence de réticulant potentiellement toxique. Ainsi, la complexation polyélectrolyte est un procédé vert d'élaboration de matériaux dispersés ou massifs et polyvalent de part la diversité des polymères pouvant être mis en en jeux.

Le contrôle de l'auto-association des polyélectrolytes reste un enjeu important car il permettra de maîtriser les propriétés des matériaux obtenus et donc d'optimiser leurs performances en fonctions des applications visées. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse, comme nous l'allons voir dans la partie suivante.

## Références bibliographiques

---



1. De Gennes, P.-G. Scaling concept in polymer physic. *Cornell University Press* (1979).
2. Perrin, P. & Hourdet, D. Polymères en solution. *Techniques de l'ingénieur A3050* (1997).
3. Wang, S., Granick, S. & Zhao, J. Charge on a weak polyelectrolyte. *J. Chem. Phys.* **129**, 241102 (2008).
4. Dobrynin, A. & Rubinstein, M. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog. Polym. Sci.* **30**, 1049–1118 (2005).
5. Manning, G. S. Polyelectrolytes. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **23**, 117–140 (1972).
6. O'Shaughnessy, B. & Yang, Q. Manning-Oosawa counterion condensation. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 048302 (2005).
7. Oosawa, F. Polyelectrolytes. *New York: Marcel Dekker* (1971).
8. Schatz, C. Chitosane : comportement en solution et formation de particules. *Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon I* (2003).
9. Limbach, H. J., Holm, C. & Kremer, K. Conformations and solution structure of polyelectrolytes in poor solvent. *Macromol. Symp.* **211**, 43–54 (2004).
10. Holm, C., Joanny, J.F., Kremer, K., Netz, R.R., Reineker, P., Seidel, C., Vilgis, T.A. & Winkler, R.G. Polyelectrolyte Theory. *Adv Polym Sci* **166**, 67–111 (2004).
11. Joanny, J. & Leibler, L. Weakly charged polyelectrolytes in poor solvent. *J. Phys. Fr.* **51**, 545–557 (1990).
12. Muthukumar, M. Counterion adsorption theory of dilute polyelectrolyte solutions: apparent molecular weight, second virial coefficient, and intermolecular structure factor. *J. Chem. Phys.* **137**, 034902 (2012).
13. Barrat, J.-L. & Joanny, F. Theory of polyelectrolyte solutions. *Adv. Chem. Phys: Polymeric Systems.* **94** 1–66 (1995).



14. De Gennes, P.-G., Pincus, P., Velasco, R. M. & Brochard, F. Remarks on polyelectrolyte conformation. *J. Phys. France* **37**, 1461–1473 (1976).
15. Khokhlov, A. On the collapse of weakly charged polyelectrolytes. *J. Phys. A: Math. Gen* **13**, 979 (1980).
16. Pfeuty, P. Conformation des polyélectrolytes ordre dans les solutions de polyélectrolytes. *J. Phys. Colloques* **39**, C2-149–C2-160 (1978).
17. Dobrynin, A.V, Colby, R. H. & Rubinstein, M. Scaling Theory of Polyelectrolyte Solutions. *Macromolecules* **28**, 1859–1871 (1996).
18. Manning, G.S. Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions II. Self-Diffusion of the Small Ions. *J. Chem. Phys.* **51**, 934 (1969).
19. Dautzenberg, H., Jeager, W., Philipp, B., Seidel, C. & Stscherbina, D. Polyelectrolytes : Formation, Characterization and Application. *Ohio: Hanser Gardner* (1994).
20. Nordmeier, E. & Beyer, P. Nonstoichiometric Polyelectrolyte Complexes : A Mathematical Model and Some Experimental Results. *J. Polym. Sci. B: Polymer Physics.* **37**, 335–348 (1999).
21. Carrillo, J.-M. Y. & Dobrynin, A. V. Polyelectrolytes in Salt Solutions: Molecular Dynamics Simulations. *Macromolecules* **44**, 5798–5816 (2011).
22. Combet, J. Structure des solutions de polyélectrolytes : Apport de la diffusion des rayons X et des neutrons aux petits angles. *Journées de la Neutronique 17, Neutrons et Matière Molle, Collection SNF.* **11**, 153–176 (2010).
23. Cai, J., Cheng, R. & Bo, S. Effect of concentration reduction due to adsorption on the reduced viscosity of polymer solution in extremely dilute concentration regime. *Polymer.* **46**, 10457–10465 (2005).
24. Wolff, C. Viscosité. *Techniques de l'ingénieur R2350* (1982).

25. Huggins, M. L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. *J. Am. Chem. Soc* **64**, 2716–2718 (1942).
26. Tsaih, M. L. & Chen, R. H. Effect of molecular weight and urea on the conformation of chitosan molecules in dilute solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **20**, 233–40 (1997).
27. Antonietti, M., Briel, A. & Förster, S. Intrinsic viscosity of small spherical polyelectrolytes: Proof for the intermolecular origin of the polyelectrolyte effect. *J. Chem. Phys.* **105**, 7795 (1996).
28. Korecz, L., Adkvari, E. & Tüdös, F. Physical chemistry of polyelectrolytes. 1. Viscometry of a polyacid in salt-free aqueous solution. *Polym. Bull.* **19**, 493–500 (1988).
29. Wolff, C. Viscosité des Solutions de Polyélectrolytes. *J. Phys. Colloq.* **39** Numéro C2, C2–169–C2–174 (1978).
30. Fuoss, R. M. & Strauss, U. Electrostatic interaction of polyelectrolytes and simple electrolytes. *J. Polym. Sci.* **3**, 602–603 (1948).
31. Guinier, A. & Fournet, G. Small angle scattering of X-rays. *New York : John Wiley & sons, Inc* (1955).
32. Feigin, L. A. & Svergun, D. Structure analysis by small angle X-rays and neutrons scattering. *Plenum Press. New York and London* (1987).
33. Popa-Nita, S., Rochas, C., David, L. & Domard, A. Structure of natural polyelectrolyte solutions: role of the hydrophilic/hydrophobic interaction balance. *Langmuir* **25**, 6460–8 (2009).
34. Essafi, W., Lafuma, F. & Williams, C. E. Structural evidence of charge renormalization in semi-dilute solutions of highly charged polyelectrolytes. *Eur. Phys. J. B - The Condensed Matter and Complex Systems* **9**, 261–266 (1999).

35. Boucard, N., David, L., Rochas, C., Montembault, A., Viton, C., & Domard, A. Polyelectrolyte microstructure in chitosan aqueous and alcohol solutions. *Biomacromolecules* **8**, 1209–1217 (2007).
36. Popa-Nita, S. Continuum d'organisation structurale de la solution à l'hydrogel physique de polysaccharides. *Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon 1* (2008).
37. Nishida, K., Kaji, K. & Kanaya, T. Charge Density Dependence of Correlation Length Due to Electrostatic Repulsion in Polyelectrolyte Solutions. *Macromolecules* **28**, 2472–2475 (1995).
38. Baigl, D., Ober, R., Qu, D., Fery, A. & Williams, C.E. Correlation length of hydrophobic polyelectrolyte solutions. *Europhys. Lett.* **62**, 588 (2003).
39. Waigh, T. a., Ober, R., Williams, C. E. & Galin, J.-C. Semidilute and Concentrated Solutions of a Solvophobic Polyelectrolyte in Nonaqueous Solvents. *Macromolecules* **34**, 1973–1980 (2001).
40. Hammouda, B. Analysis of the Beaucage model. *J. Appl. Cryst.* **43**, 1474–1478 (2010).
41. Beaucage, G. Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension. *J. Appl. Cryst.* **29**, 134–146 (1996).
42. Beaucage, G. & Schaefer, D. W. Structural studies of complex systems using small-angle scattering: a unified Guinier/power-law approach. *J. Non-Cryst. Solids* **172-174 Part 2**, 797–805 (1994).
43. Nishinari, K. & Takahashi, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.* **8**, 396–400 (2003).
44. Crescenzi, V., Dentini, M. & Coviello, T. Solution and gelling properties of polysaccharide polyelectrolytes. *Biophys. Chem.* **41**, 61–71 (1991).
45. Mikkonen, K. S., Parikka, K., Ghafar, A. & Tenkanen, M. Prospects of polysaccharide aerogels as modern advanced food materials. *Trends Food Sci. & Technol.* **34**, 124–136 (2013).

46. Muzzarelli, R. A.A., Greco, F., Busilacchi, A., Sollazzo, V. & Gigante, A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydr. Polym.* **89**, 723–739 (2012).
47. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **31**, 603–632 (2006).
48. Suh, F. J.-K. & Matthew, H. W.T Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials* **21**, 2589–98 (2000).
49. Klein, S. Polysaccharide materials: Performance by design. ACS Symposium Series: AVS, Washington, DS. 13–30 (2009).
50. Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C. & Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1650–62 (2008).
51. Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C. & Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J. Control. Release* **119**, 5–24 (2007).
52. Matricardi, P., Di Meo, C., Coviello, T., Hennink, W.E. & Alhaique, F. Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1172–87 (2013).
53. Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon, Y.-J. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. & Technol.* **10**, 37–51 (1999).
54. Rinaudo, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym. Int.* **57**, 397–430 (2008).
55. Sogias, I. A., Williams, A. C. & Khutoryanskiy, V. V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules* **9**, 1837–42 (2008).
56. Shaikh, R., Singh, T. R. R., Garland, M. J., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F. Mucoadhesive drug delivery systems. *J. Pharm Bioallied Sci* **3**, 89–100 (2011).

57. Khurana, S. & Madhav, N. V. S. Mucoadhesive drug delivery : mechanism and method of evaluation. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **2**, 458–467 (2011).
58. Roberts, G. A. F. Chitin chemistry. *Macmillan* (1992).
59. Cauchie, H.M. An attempt to estimate crustacean chitin production in the hydrosphere. *Advances in Chitin Science*, Domard, A., Roberts, G.A.F., Varum, K.M. (Eds), Jacques Andre Publishers, Lyon, France. **2**, 32–39 (1998).
60. Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S.-I., Shimoda, K. Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **31**, 485–491 (1993).
61. Rouget, C. Des substances amylacées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (Chitine). *Compt. Rend. Acad. Sci.* **48**, 792-795 (1859).
62. Domard, A. Physicochemical properties of chitinous materials. *Adv. Chitin Sci.* **3**, 24–38 (1998).
63. Desbrières, J. Chitine et chitosane. *J Acta Chim 11/12* **39**, 39–44 (2002).
64. Ravi Kumar, M. N. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **46**, 1–27 (2000).
65. Lamarque, G. *Elaboration et caractérisation de nouveaux éliciteurs à base de chitosane pour la protection des espèces végétales. Thèse de doctorat. Université Lyon1.* (2004).
66. Sorlier, P., Denuzière, A, Viton, C. & Domard, A. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* **2**, 765–72 (2001).
67. Sorlier, P., Viton, C. & Domard, A. Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: role of aging. *Biomacromolecules* **3**, 1336–42 (2002).

68. Kurita, K., Kamiya, M. & Nishimura, S.-I. Solubilization of a rigid polysaccharide: Controlled partial N-Acetylation of chitosan to develop solubility. *Carbohydr. Polym.* **16**, 83–92 (1991).
69. Kubota, N. & Eguchi, Y. Facile Preparation of Water-Soluble N-Acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-Solubility. *Polym. J.* **29**, 123–127 (1997).
70. Lamarque, G., Cretenet, M., Viton, C. & Domard, A. New route of deacetylation of alpha- and beta-chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. *Biomacromolecules* **6**, 1380–8 (2005).
71. Varum, K. M., Ottoy, M. H. & Smidsrod, O. Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH : effect of chemical composition and depolymerisation. *Carbohydr. Polym.* **25**, 65–70 (1994).
72. Osorio-Madrado, A., David, L., Trombotto, S., Lucas, J.-M., Peniche-Covas, C., Domard, A. Highly crystalline chitosan produced by multi-steps acid hydrolysis in the solid-state. *Carbohydr. Polym.* **83**, 1730–1739 (2011).
73. Osorio-Madrado, A. David, L., Trombotto, S., Lucas, J.-M., Peniche-Covas, C., Domard, A. Kinetics study of the solid-state acid hydrolysis of chitosan: evolution of the crystallinity and macromolecular structure. *Biomacromolecules* **11**, 1376–86 (2010).
74. Zhou, H. Y. Chen, X.G., Kong, M., Liu, C.S., Cha, D.S., Kennedy, J.F. Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. *Carbohydr. Polym.* **73**, 265–273 (2008).
75. Chattopadhyay, D. P. & Inamdar, M. S. Aqueous Behaviour of Chitosan. *Int. J. Polym. Sci.* **2010**, 1–7 (2010).
76. Cho, Y. W., Jang, J., Park, C. R. & Ko, S. W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* **1**, 609–14 (2000).

77. Brugnerotto, J., Desbrières, J., Heux, L., Mazeau, K. & Rinaudo, M. Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution. *Macromol. Symp.* **168**, 1–20 (2001).
78. Rinaudo, M., Pavlov, G. & Desbrieres, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer (Guildf)*. **40**, 7029–7032 (1999).
79. Cataldo, S., Crea, F., Gianguzza, A., Pettignano, A. & Piazzese, D. Solubility and acid-base properties and activity coefficients of chitosan in different ionic media and at different ionic strengths, at T=25°C. *J. Mol. Liq.* **148**, 120–126 (2009).
80. Rinaudo, M., Milas, M. & Le Dung, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 281–5 (1993).
81. Maghami, G. & Roberts, G. A. F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Die Makromol. Chemie* **189**, 195–200 (1988).
82. Anthonsen, M. W., Varum, Kjell, M. & Smidsrod, O. Solution properties of chitosans : conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Carbohydr. Polym.* **22**, 193–201 (1993).
83. Berth, G. & Dautzenberg, H. The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution. *Carbohydr. Polym.* **47**, 39–51 (2002).
84. Wang, W., Bo, S. Q., Li, S. Q. & Qin, W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 281–5 (1991).
85. Lamarque, G., Lucas, J.-M., Viton, C. & Domard, A. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: role of various structural parameters. *Biomacromolecules* **6**, 131–42 (2005).
86. Brugnerotto, J., Desbrières, J., Roberts, G. & Rinaudo, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer (Guildf)*. **42**, 9921–9927 (2001).

87. Signini, R., Desbrières, J. & Campana Filho, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. *Carbohydr. Polym.* **43**, 351–357 (2000).
88. Terbojevich, M., Cosani, A., Conio, G., Marsano, E. & Bianchi, E. Chitosan: chain rigidity and mesophase formation. *Carbohydr. Res.* **209**, 251–260 (1991).
89. Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C. & Domard, A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* **4**, 641–8 (2003).
90. Crini, G., Badot, P.-M. & Guibal, E. Chitine et chitosane. Du biopolymère à l'application. *Presses universitaires de Franche-Comté* (2009).
91. Tsaih, M. L. & Chen, R. H. Effects of Ionic Strength and pH on the Diffusion Coefficients and Conformation of Chitosans. *J App Polym Sci* **73**, 2041–2050 (1999).
92. Cho, J., Heuzey, M.-C., Bégin, A. & Carreau, P. J. Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. *J. Food Eng.* **74**, 500–515 (2006).
93. Kubota, N., Tatsumoto, N., Sano, T. & Toya, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr. Res.* **324**, 268–74 (2000).
94. Vachoud, L., Zydowicz, N. & Domard, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydr. Res.* **302**, 169–177 (1997).
95. Xie, Y., Hu, J., Wei, Y. & Hong, X. Preparation of chitooligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Polym. Degrad. Stab.* **94**, 1895–1899 (2009).
96. Xia, W., Liu, P. & Liu, J. Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases. *Bioresour. Technol.* **99**, 6751–62 (2008).
97. Li, J., Du, Y., Yang, J., Feng, T., Li, A., Chen, P. Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polym. Degrad. Stab.* **87**, 441–448 (2005).



98. Popa-Nita, S., Lucas, J.-M., Ladavière, C., David, L. & Domard, A. Mechanisms involved during the ultrasonically induced depolymerization of chitosan: characterization and control. *Biomacromolecules* **10**, 1203–11 (2009).
99. Chen, Q., Xiao, W., Zhou, L., Wu, T. & Wu, Y. Hydrolysis of chitosan under microwave irradiation in ionic liquids promoted by sulfonic acid-functionalized ionic liquids. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 49–53 (2012).
100. Allan, G. G. & Peyron, M. Molecular weight manipulation of chitosan II : prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydr. Res.* **277**, 273–282 (1995).
101. Tømmeraas, K., Vårum, K. M., Christensen, B. E. & Smidsrød, O. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohydr. Res.* **333**, 137–44 (2001).
102. Allan, G. G. & Peyron, M. Molecular weight manipulation of chitosan. I: Kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydr. Res.* **277**, 257–72 (1995).
103. Sarmento, B. Martins, S., Ribeiro, A., Veiga, F., Neufeld, R., Ferreira, D. Development and Comparison of Different Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes as Insulin Carriers. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **12**, 131–138 (2006).
104. Sarmento, B., Ribeiro, A., Veiga, F. & Ferreira, D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **53**, 193–202 (2006).
105. Mozhaev, V. V. Denaturation, proteins, solvent mediated. *Encycl. bioprocess Technol.* 795–861 (2002).
106. Ricketts, C. Dextran sulfate - A synthetic analogue of heparin. *Biochem* **51**, 129–133 (1952).
107. Solomon, L., Mansor, S., Mallon, P., Donnelly, E., Hoper, M., Loughrey, M., Kirk, S., Gardiner, K. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comp. Clin. Path.* **19**, 235–239 (2010).

108. Beyer, P. & Nordmeier, E. Some phenomena of counterion condensation on dextran sulphate. *Eur. Polym J* **31**, 1031–1036 (1995).
109. Suzuki, K. & Hashimoto, S. Effect of dextran sulphates on thrombin activity. *J. Clin. Pathol.* **32**, 439–444 (1979).
110. Tiyaaboonchai, W. & Limpeanchob, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **329**, 142–9 (2007).
111. Nordmeier, E. Static and Dynamic Light-scattering solution behavior of pullulan and dextran in comparison. *J. Phys. Chem* **97**, 5770–5785 (1993).
112. Kijewska, I., Piaseczna, J. & Hawlicka, E. Interaction of heparin and dextran sulphate with alkali ions. *J. Mol. Liq.* **159**, 70–75 (2011).
113. Rabenstein, D. L. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 312–331 (2002).
114. Sasisekharan, R. & Venkataraman, G. Heparin and heparan sulfate : biosynthesis , structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 626–631 (2000).
115. Lee, D. Y., Lee, J., Lee, S., Kim, S. K. & Byun, Y. Lipophilic complexation of heparin based on bile acid for oral delivery. *J. Control. Release* **123**, 39–45 (2007).
116. Salmivirta, M., Lidholt, K. & Lindahl, U. Heparan sulfate : a piece of information. *FASEB J.* **10**, 1270–1279 (1996).
117. Linhardt, R. J. Heparin: structure and activity. *J. Med. Chem.* **46**, 2551–64 (2003).
118. Laremore, T. N., Zhang, F., Dordick, J. S., Liu, J. & Robert, J. Recent progress and applications in glycosaminoglycan and heparin research. *Curr Opin Chem Biol* **13**, 633–640 (2009).
119. Elalamy, I. Héparines : structure, propriétés pharmacologiques et activités. *EMC (Elsevier Masson SAS Paris), Hématologie* 1–13 (2010).

120. Korir, A. K. & Larive, C. K. Advances in the separation, sensitive detection, and characterization of heparin and heparan sulfate. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 155–69 (2009).
121. Jones, C. J., Beni, S., Limtiaco, J. F. K., Langeslay, D. J. & Larive, C. K. Heparin characterization: challenges and solutions. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)*. **4**, 439–65 (2011).
122. Wu, J., Zhang, C., Mei, X., Li, Y. & Xing, X.-H. Controllable production of low molecular weight heparins by combinations of heparinase I/II/III. *Carbohydr. Polym.* **101**, 484–92 (2014).
123. Fengchun, Y., Ying, K., Shuo, C., Chong, Z., Yin, C., Xin-Hui, X. Characteristics of low molecular weight heparin production by an ultrafiltration membrane bioreactor using maltose binding protein fused heparinase I. *Biochem. Eng. J.* **46**, 193–198 (2009).
124. Achour, O., Bridiau, N., Godhbani, A., Le Joubioux, F., Bordenave Juchereau, S., Sannier, F., Piot, J.M., Fruitier Amaudin, I., Maugard, T. Ultrasonic-assisted preparation of a low molecular weight heparin (LMWH) with anticoagulant activity. *Carbohydr. Polym.* **97**, 684–9 (2013).
125. Higashi, K., Hosoyama, S., Ohno, A., Masuko, S., Yang, B., Sterner, E., Wang, Z., Linhardt, R.J., Toida, T. Photochemical Preparation of a Novel Low Molecular Weight Heparin. *Carbohydr. Polym.* **67**, 1737–1743 (2012).
126. Hoppensteadt, D., Walenga, J. M., Fareed, J. & Bick, R. L. heparin, low-molecular-weight heparins, and heparin pentasaccharide Basic and clinical differentiation. *Hematol Oncol Clin N Am* **17**, 313–341 (2003).
127. Conrad, H. E. Dissection of heparin - past and future. *Pure Appl. Chem.* **65**, 787–791 (1993).
128. Gunay, N. S. & Linhardt, R. J. Heparinoids: structure, biological activities and therapeutic applications. *Planta Med.* **65**, 301–6 (1999).

129. Wilson, J. W. Heparin sodium : a review. *Extracorpor. Pharmacol. heparin* **VI**, 207–213 (1974).
130. Linhardt, R. J. & Liu, J. Synthetic heparin. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 217–9 (2012).
131. Linhardt, R. J. & Gunay, N. S. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Semin. Thromb. Hemost.* **25 Suppl 3**, 5–16 (1999).
132. Turnbull, J. E. Getting the farm out of pharma for heparin production. *Science (80-. )*. **334**, 462–3 (2011).
133. Petitou, M. Chimie de l'héparine. *Lett. des Sci. du CNRS, L'actualité Chim.* **18**, 18–21 (1999).
134. Capila, I. & Linhardt, R. J. Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 391–412 (2002).
135. Chappell, E. P. & Liu, J. Use of biosynthetic enzymes in heparin and heparan sulfate synthesis. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 4786–92 (2013).
136. Xu, Y., Pempe, E. H. & Liu, J. Chemoenzymatic synthesis of heparin oligosaccharides with both anti-factor Xa and anti-factor IIa activities. *J. Biol. Chem.* **287**, 29054–61 (2012).
137. Mulloy, B. & Forster, M. J. Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology* **10**, 1147–56 (2000).
138. Pavlov, G., Finet, S., Tatarenko, K., Korneeva, E. & Ebel, C. Conformation of heparin studied with macromolecular hydrodynamic methods and X-ray scattering. *Eur. Biophys. J.* **32**, 437–49 (2003).
139. Kikuchi, Y. & Fukuda, H. Polyelectrolyte complex of sodium dextran sulfate with chitosan. *Macromol. Chem. Phys.* **175**, 3593–3596 (1974).
140. Delair, T. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78**, 10–8 (2011).

141. Kikuchi, Y. Polyelectrolyte complex of heparin with chitosan. *Macromol. Chem. Phys.* **175**, 2209–2211 (1974).
142. Boddohi, S., Moore, N., Johnson, P. a & Kipper, M. J. Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan. *Biomacromolecules* **10**, 1402–9 (2009).
143. Thünemann, A. F., Müller, M., Dautzenberg, H., Joanny, J. & Löwen, H. Polyelectrolyte Complexes. *Adv Polym SciSci* **166**, 113–171 (2004).
144. Lankalapalli, S. & Kolapalli, V. R. . Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology. *Indian J Pharm Sci.* **71**, 481,487 (2009).
145. Michaels, A. S. & Miekka, R. G. Polycation-polyanion complexes: Preparation and properties of poly-(vinylbenzyltrimethylammonium) poly-(styrenesulfonate)." *J. Phys. Chem.* 65: 1765-1773. *J. Phys. Chem.* **65**, 1765–1773 (1961).
146. Kabanov, V. A. & Zezin, A. Soluble interpolymeric complexes as a new class of synthetic polyelectrolytes. *Pure Appl. Chem* **56**, 343–354 (1984).
147. Kabanov, V. A. & Zezin, A. B. A new class of complex water-soluble polyelectrolytes. *Macromol. Chem. Phys.* **6**, 259–276 (1984).
148. Kabanov, V. A. In: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Dubin P, Bock J, Davis R, Schulz DN, Thies C, editors. New York: Springer, 151–174 (1994).
149. Tsuchida, E. & Abe, K. Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes. *Advances in Polymer Science*. H.-J. Cantow, G. Dall'Asta et al., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 45: 1-130. *Adv. Polym. Sci.* **45**, 1–130 (1982).
150. Tsuchidaa, E., Osadaab, Y. & Ohnoa, H. Formation of interpolymer complexes. *J. Macromol. Sci. Part B Phys.* **17**, 683–714 (1980).
151. Tsuchida, E. & Abe, K. Polyelectrolyte complexes. *Development in ionic polymers-2*. London, New York: Elsevier Applied Science Publishers, 191–266 (1986).

152. Dautzenberg, H. Polyelectrolyte Complex Formation in Highly Aggregating Systems. 1. Effect of Salt: Polyelectrolyte Complex Formation in the Presence of NaCl. *Macromolecules* **9297**, 7810–7815 (1997).
153. Gärdlund, L., Wågberg, L. & Norgren, M. New insights into the structure of polyelectrolyte complexes. *J. Colloid Interface Sci.* **312**, 237–46 (2007).
154. Petrov, A. I., Antipov, A. A. & Sukhorukov, G. B. Base - Acid Equilibria in Polyelectrolyte Systems: From Weak Polyelectrolytes to Interpolyelectrolyte Complexes and Multilayered Polyelectrolyte Shells. *Macromolecules* 10079–10086 (2003).
155. Sæther, H. V., Holme, H. K., Maurstad, G., Smidsrød, O. & Stokke, B. T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydr. Polym.* **74**, 813–821 (2008).
156. Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C. & Delair, T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* **5**, 1882–92 (2004).
157. Bharadwaj, S., Montazeri, R. & Haynie, D. T. Direct determination of the thermodynamics of polyelectrolyte complexation and implications thereof for electrostatic layer-by-layer assembly of multilayer films. *Langmuir* **22**, 6093–6101 (2006).
158. Petzold, G., Buchhammer, H.-M. & Lunkwitz, K. The use of oppositely charged polyelectrolytes as flocculants and retention aids. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **119**, 87–92 (1996).
159. Schatz, C., Lucas, J.-M., Viton, C., Domard, A., Pichot, C., Delair, T. Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir* **20**, 7766–78 (2004).
160. Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science (80-. ).* **277**, 1232–1237 (1997).

161. Lvov, Y., Decher, G. & Mohwald, H. Assembly, Structural Characterization, and Thermal Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(vinyl sulfate) and Poly(allylamine). 481–486 (1993).
162. Dautzenberg, H., Gao, Y. & Hahn, M. Formation , Structure , and Temperature Behavior of Polyelectrolyte Complexes between Ionically Modified Thermosensitive Polymers †. 9070–9081 (2000).
163. Shiratori, S. S. & Rubner, M. F. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules* **33**, 4213–4219 (2000).
164. Bakeev, K. N., Izumrudov, V. A., Kuchanov, S. I., Zezin, A. B. & Kabanov, V. A. Kinetics and mechanism of interpolyelectrolyte exchange and addition reactions. *Macromolecules* **25**, 4249–4254 (1992).
165. Kudlay, A., Ermoshkin, A. V. & Olvera de la Cruz, M. Complexation of Oppositely Charged Polyelectrolytes: Effect of Ion Pair Formation. *Macromolecules* **37**, 9231–9241 (2004).
166. Dautzenberg, H. Polyelectrolyte Complex Formation in Highly Aggregating Systems. 1. Effect of Salt: Polyelectrolyte Complex Formation in the Presence of NaCl. *Macromolecules* **30**, 7810–7815 (1997).
167. Dautzenberg, H. & Rother, G. Response of Polyelectrolyte Complexes to Subsequent Addition of Sodium Chloride: Time-Dependent Static Light Scattering Studies. *Macromol. Chem. Phys.* **205**, 114–121 (2004).
168. Buchhammer, H.-M., Mende, M. & Oelmann, M. Formation of mono-sized polyelectrolyte complex dispersions: effects of polymer structure, concentration and mixing conditions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **218**, 151–159 (2003).
169. Chen, Y., Mohanraj, V. J., Wang, F. & Benson, H. A.E. Designing chitosan-dextran sulfate nanoparticles using charge ratios. *AAPS PharmSciTech* **8**, E98 (2007).
170. Liu, Z., Jiao, Y., Liu, F. & Zhang, Z. Heparin / chitosan nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 806–812 (2007).

171. Sarmento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Ferreira, D. & Neufeld, R. Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. *Biomacromolecules* **8**, 3054–60 (2007).
172. Weber, C., Drogoz, A., Domard, A., Charles, M.H., Verrier, B., Delair, T. Polysaccharide-based vaccine delivery systems: Macromolecular assembly, interactions with antigen presenting cells, and in vivo immunomonitoring. *J. Biomed. Mater. Res. A* **93**, 1322–34 (2010).
173. Motwani, S.K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F.J., Khar, R.K. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 513–25 (2008).
174. De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. Novel hyaluronan-based nanocarriers for transmucosal delivery of macromolecules. *Macromol. Biosci.* **8**, 441–50 (2008).
175. Janes, K. A, Fresneau, M. P., Marazuela, A, Fabra, A & Alonso, M. J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J. Control. Release* **73**, 255–67 (2001).
176. Hartig, S.M., Greene, R., Carlesso, G., Higginbotham, J.N., Khan, W.N., Prokop, A., Davidson, J.M. Kinetic analysis of nanoparticulate polyelectrolyte complex interactions with endothelial cells. *Biomaterials* **28**, 3843–55 (2007).
177. Liu, W., Sun, S., Cao, Z., Zhang, X., Yao, K., Lu, W.W., Luk, K.D. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials* **26**, 2705–11 (2005).
178. Van der Lubben, I. M., Verhoef, J. C., Borchard, G. & Junginger, H. E. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **14**, 201–7 (2001).
179. Chen, Y., Mohanraj, V. J. & Parkin, J. E. Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide. *Lett. Pept. Sci.* **10**, 621–629 (2003).



180. Boddohi, S. & Kipper, M. J. Engineering nanoassemblies of polysaccharides. *Adv. Mater.* **22**, 2998–3016 (2010).
181. Jean, M., Smaoui, F., Lavertu, M., Méthot, S., Bouhdoud, L., Buschmann, M.D., Merzouki, A. Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Ther.* **16**, 1097–110 (2009).
182. Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N. & Buschmann, M. D. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* **27**, 4815–24 (2006).
183. Drogoz, A., Munier, A., Verrier, B., David, L., Domard, A., Delair, T. Towards biocompatible vaccine delivery systems: interactions of colloidal PECs based on polysaccharides with HIV-1 p24 antigen. *Biomacromolecules* **9**, 583–91 (2008).
184. Tiyafoonchai, W., Woiszwilllo, J. & Middaugh, C. R. Formulation and characterization of amphotericin B-polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **90**, 902–14 (2001).
185. Polexe, R.C., Terrat, C., Verrier, B., Civillier, A., Champier, G., Delair, T. Elaboration of targeted nanodelivery systems based on colloidal polyelectrolyte complexes (PEC) of chitosan (CH)-dextran sulphate (DS). *Eur. J. Nanomedicine* **5**, 39–49 (2013).
186. Tan, M. L., Friedhuber, A. M., Dunstan, D. E., Choong, P. F. M. & Dass, C. R. The performance of doxorubicin encapsulated in chitosan-dextran sulphate microparticles in an osteosarcoma model. *Biomaterials* **31**, 541–51 (2010).
187. Bhattarai, N., Gunn, J. & Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 83–99 (2010).
188. Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 19–34 (2004).

189. Peppas, N.A, Bures, P., Leobandung, W. & Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27–46 (2000).
190. Peppas, N.A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, a. & Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345–1360 (2006).
191. Peppas, N.A. Hydrogels in medicine and pharmacy, *in: N.A. Peppas (Ed.), Fundamentals, vol. 1, CRC Press.* (1986).
192. Joanny, J. The sol-gel transition. *Phys. B Condens. Matter* **156**, 381–385 (1989).
193. Berger, J., Reist, M., Mayer, J., Felt, O. & Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 35–52 (2004).
194. Sakiyama, T., Chu, C.-H., Fuji, T. & Yano, T. Preparation of a polyelectrolyte complex gel from chitosan and k-Carrageenan and its pH-sensitive swelling. *J App Polym Sci* **50**, 2021–2025 (1993).
195. Sakiyama, T., Takata, H., Kikuchi, M. & Nakanishi, K. Polyelectrolyte complex gel with high pH-sensitivity prepared from dextran sulfate and chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **73**, 2227–2233 (1999).
196. Takahashi, T., Takayama, K., Machida, Y. & Nagai, T. Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate. *Int. J. Pharm.* **61**, 35–41 (1990).
197. Lee, K. Y., Park, W. H. & Ha, W. S. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *J. Appl. Polym. Sci.* **63**, 425–432 (1997).
198. Fukuda, H. & Kikuchi, Y. Polyelectrolyte complexes of sodium dextran sulfate with chitosan 2. *Macromol. Chem. Phys.* **178**, 2895–2899 (1977).

199. Daly, M. . & Knorr, D. Chitosan-alginate complex coacervate capsules: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability. *Biotechnol. Prog.* **4**, 76–81 (1988).
200. Sakiyama, T., Takata, H., Toga, T. & Nakanishi, K. pH-Sensitive Shrinking of a Dextran Sulfate / Chitosan Complex Gel and Its Promotion Effect on the Release. *J. Appl. Polym. Sci.* **81**, 667–674 (2001).
201. Takka, S. & Acarturk, F. Calcium alginate microparticles for oral administration: I: effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency. *J. Microencapsul.* **16**, 275–290 (1999).
202. Chupa, J. M., Foster, A.M., Sumner, S. R., Madihally, S. V & Matthew, H. W. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials* **21**, 2315–22 (2000).
203. Kratz, G., Back, M., Arnander, C. & Larm, O. Immobilised heparin accelerates the healing of human wounds in vivo. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* **32**, 381–385 (1998).
204. Shahadeddin, L., Damour, O., Berthod, F., Rouselle, P., Saintigny, G. Reconstructed skin from co-cultured human keratinocytes and fibroblasts on a chitosane cross-linked collagen-GAG matrix. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2**, 222–226 (1991).

Deuxième partie.

Les complexes colloïdaux  
multifonctionnels à base de  
polysaccharides

---



## I. Introduction

L'introduction d'une substance quelconque dans le corps engendre une réponse immédiate de l'organisme qui se traduit par la dégradation et la métabolisation enzymatique de ces molécules. Ce phénomène biologique associé parfois à des propriétés physicochimiques des molécules thérapeutiques inadaptées aux conditions physiologiques (hydrophilie, hydrophobie, masse moléculaire trop importante pour franchir les barrières biologiques...) altèrent leur biodisponibilité, diminuant ainsi considérablement leur performance. Plus la biodisponibilité est faible, plus la dose administrée est élevée, afin que le seuil de bio activité soit atteint. Il en résulte un faible index thérapeutique, ainsi que des effets secondaires importants. Cela peut devenir crucial dans le traitement de pathologies lourdes comme le cancer ou certaines maladies infectieuses.

Au début du siècle dernier, le chercheur allemand Paul Ehrlich, énonçait le concept de « magic bullets »<sup>1,2</sup>, des systèmes de délivrances capables d'atteindre une cible spécifique, au sein d'un organisme, en épargnant les autres tissus. Les avancées technologiques en nanosciences et nanotechnologies commencent à traduire dans la réalité ce concept visionnaire. En thérapeutique, ces « balles magiques » sont des nanomédicaments constitués d'un principe actif contenu dans un vecteur de taille nanométrique capable de franchir les obstacles biologiques de l'organisme afin de délivrer de manière contrôlée ce principe actif sur un site prédéfini<sup>3</sup>, rendant ainsi les traitements plus spécifiques, plus efficaces et moins toxiques.

Le développement de la vectorisation et du ciblage thérapeutique s'est fait par l'exploitation de plusieurs pistes. L'une d'elles est la mise au point de vecteurs synthétiques constitués de polymères ou d'organisation supramoléculaire de lipides, non solubles en milieu aqueux, capables de piéger une grande quantité de molécule actives : nanocapsules<sup>4</sup>, nanosphères<sup>5</sup> et liposomes<sup>6</sup>. Pour atteindre leur cible, ces nanosystèmes sont décorés de ligands de ciblage actifs<sup>7</sup> capables de se lier sur la membrane d'une cellule cible,<sup>8</sup> voire à l'intérieur de cette cellule<sup>9</sup>, dans son cytoplasme ou son noyau<sup>9</sup>.

En dépit de ces avantages, très peu de ces systèmes sont actuellement en développement clinique<sup>10</sup>. Une des raisons qui peut expliquer cette percée limitée réside dans les méthodes de

fabrication qui requièrent très souvent l'utilisation de solvants organiques ou d'importante énergie d'émulsification<sup>11</sup>. Pour réduire le coût, l'impact environnemental et accroître la sécurité de ces systèmes, il est absolument essentiel d'élaborer un procédé simple, non toxique, réalisable uniquement dans l'eau et utilisant des matrices d'origine naturels biodégradables, biocompatibles et biorésorbables.

De plus, il faut garder à l'esprit que la voie d'administration des nanomédicaments doit être la moins invasive et la plus confortable possible pour les patients afin de garantir une sécurité et une compliance maximales. Dans ce contexte, la voie d'administration la plus prometteuse est la voie orale, Mais sa mise en œuvre impose des contraintes importantes de formulation pour résister aux conditions physicochimiques particulières du milieu gastro-intestinal.

Mon sujet de recherche a pour objet le développement de systèmes d'assemblage nanométriques pour la délivrance orale et le ciblage thérapeutique de principe actifs. Pour répondre aux mieux aux problèmes de formulation soulevés plus haut, le cahier des charges est le suivant:

- Concevoir des vecteurs colloïdaux à base de polysaccharides, connus pour leurs propriétés biologiques, exempts de produits chimiques potentiellement toxiques.
- Le procédé devra être simple à mettre en œuvre (processus en une étape), transposable à plus grande échelle et permettre l'encapsulation de principes actifs.
- Les nanosystèmes ainsi formulés devront permettre la fonctionnalisation par des ligands de ciblage de type IgA, résistants aux tractus gastro-intestinal tout en maintenant une bonne stabilité en milieu physiologique.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet collaboratif de type ANR, d'acronyme PECSDDeli, dont l'objectif est de délivrer des antirétroviraux dans les réservoirs naturels du virus du sida, que sont les cellules sous-épithéliales de l'intestin. Les cellules infectées sur-expriment le ligand  $\alpha 4\beta 7$  qui sera reconnu par des anticorps humanisés de type IgA.

## II. Elaboration de colloïdes par association contrôlée de biopolymères

La complexation de polyélectrolytes de charges opposées<sup>13</sup> permet d'obtenir des particules de taille colloïdale, sans utilisation de tensioactifs, de réticulants<sup>14</sup> ni de solvant organique, ce qui permet de considérer ce procédé comme étant sûr pour les patients et respectueux de l'environnement. Comme nous l'avons vu au chapitre précédemment, les caractéristiques et propriétés des particules sont étroitement liées aux conditions réactionnelles : le rapport de charges ( $n^+/n^-$ ), le pH du milieu, la concentration initiale en polymère et/ou aux paramètres intrinsèques des polyions : la masse molaire et leur densité de charges. Plusieurs études montrent qu'une augmentation de la concentration en polymère induit une augmentation de la taille des particules<sup>15,16</sup>. Pour ces auteurs, une concentration en polymère inférieure ou égale à 0.1% (w/v) est particulièrement adaptée à la formation de particules de tailles submicroniques. Cette dilution élevée, conduisant à des taux de solides faibles, représente une limitation de la méthode de complexation polyélectrolytique et une étape de concentration subséquente peut s'avérer indispensable pour de futures applications. Afin de pallier ce problème, et donc répondre au mieux à notre cahier des charges, nous avons développé une méthode alternative basée sur le contrôle de l'association des polyélectrolytes en modulant les interactions électrostatiques par l'ajout d'un électrolyte, le chlorure de sodium. L'élimination progressive de ce sel par dialyse conduit à la formation d'un complexe de taille nanométrique avec des concentrations en polymère environ 30 fois supérieures à celles des méthodes conventionnelles.

Ce chapitre, a pour objet de décrire les démarches expérimentales entreprises dans la mise en œuvre de cette nouvelle méthode. Une première partie expliquera la préparation des échantillons homogènes de chitosane utilisés. La seconde partie, décrit à travers des publications la mise en œuvre de la méthode de complexation contrôlée de polyélectrolytes saccharidiques ainsi que les caractéristiques des particules obtenues par association du chitosane et du sulfate de dextrane. Nous détaillerons aussi (i) les résultats de stabilité colloïdale des assemblages à base de sulfate de dextrane et d'héparine dans des milieux mimant les divers pH physiologiques, et (ii) leur capacité à vectoriser des molécules biologiques.



## 1. Préparation d'échantillons de chitosane à structure macromoléculaire contrôlée

Les échantillons de chitosane utilisés au cours de cette thèse sont fournis par la société Mahtani Chitosan (Lots 113 et 112). Ils sont obtenus par désacétylation de la chitine extraite de plumes de calamar et sont caractérisés par un faible degré d'acétylation ( $DA \sim 1.5\%$  et  $2.5\%$ ) et une masse molaire moyenne en poids de l'ordre de  $5.32 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $6.56 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ .

La première étape de préparation des échantillons consiste à purifier le chitosane. Cette étape ainsi que les techniques de caractérisations qui s'en suivent (détermination de la teneur en eau par ATG, du DA par RMN du proton et  $M_w$  par SEC-MALLS) sont largement décrites dans toutes les publications de ce manuscrit, c'est pourquoi, nous ne ferons qu'une présentation succincte.

Le chitosane est dissout dans l'acide acétique puis filtré à travers des membranes de porosités décroissantes jusqu'à  $0.45 \mu\text{m}$ . Il est ensuite neutralisé à l'aide d'une solution d'ammoniaque ( $28\% \text{ w/w}$ ), lavé à l'eau dé-ionisée et lyophilisé. La purification ainsi décrite permet l'obtention de chitosane de couleur blanche dépourvu d'insolubles facilitant ainsi sa solubilisation en milieu aqueux acide.

Pour obtenir des chitosanes de plus hauts degrés d'acétylation ( $DA$ , teneurs en groupements N-acétyl-glucosamine, GICNAc), nous avons réacétylé dans des conditions homogènes l'échantillon initial. La méthode utilisée a été mise au point par Vachoud et al.<sup>17</sup>. La réaction se déroule à température ambiante en milieu hydro-alcoolique (eau/1,2 propanediol  $50\%/50\% \text{ v/v}$ ), auquel on ajoute différentes quantités d'anhydride acétique en fonction de la valeur du  $DA$  souhaitée. Après une nuit de réaction, le polymère est précipité, lavé à l'eau dé-ionisée par centrifugation répétée jusqu'à neutralisation du pH et lyophilisé. Les conditions de cette réaction permettent de préserver la distribution statistique des motifs acétylés, d'empêcher la dégradation des chaînes polymères<sup>18</sup> mais également d'éviter toute réaction d'O-acétylation en C(6) par l'utilisation du 1,2 propanediol à viscosité élevée.

Cette méthode permet la synthèse de séries homogènes d'échantillons ayant des degrés de polymérisation comparables et de faibles polydispersités<sup>19</sup>.

Certains échantillons de chitosane ont été dépolymérisés par la méthode de Allan et Peyron<sup>20-22</sup>. Pour ce faire, le polymère est dissout dans un tampon acide à pH 4.5 et est hydrolysé par désamination nitreuse en présence de nitrite de sodium avec un rapport molaire (nombre de moles de nitrites/nombre de moles de fonctions amine) égal à 0.1. La cinétique de réaction menée préalablement sur chaque DA étudié, permet de déterminer le temps de réaction nécessaire à l'obtention de la masse désirée.

Tous les chitosane utilisés au cours de ces travaux ont été préparés de la même manière. Les méthodes de préparations décrites ci-dessus s'appliquent donc aux échantillons de ce chapitre et de ceux à venir.

## **2. Publication 1: " Reversible Controlled Assembly of Chitosan and Dextran sulfate: a new method for nanoparticle elaboration"**

L'objectif de ce travail est de développer une méthode de formulation de colloïdes par complexation contrôlée de polyélectrolytes en écrantant leurs charges par l'ajout d'un électrolyte, le chlorure de sodium. Pour mener notre étude, nous avons choisi le chitosane comme polycation et le sulfate de dextrane comme polyanion. L'historique de notre équipe et la présence d'un nombre important de publications sur l'association de ces deux composés ont motivé ce choix. Ainsi nous pourrions valider ou non l'intérêt de cette nouvelle méthode par simple comparaison des résultats.

L'utilisation du NaCl comme agent d'écrantage requiert de vérifier au préalable la solubilité des polyélectrolytes à diverses forces ioniques. Pour étudier l'influence du sel sur ce comportement, différents échantillons de chitosane ont été préparés selon les méthodes décrites au paragraphe II.1. Concernant le sulfate de dextrane, nous avons utilisé des échantillons commerciaux de différentes masses molaires et de degrés de sulfatation similaires.

La publication présente l'influence du sel sur la solubilité du chitosane et du sulfate de dextrane. Nous avons déterminé une concentration critique en sel permettant d'écranter totalement les charges de nos polyélectrolytes et donc de garder une solution limpide après mélange des deux polymères à pH=4.0. Les complexes colloïdaux sont formés après élimination progressive du NaCl par dialyse.

## **Reversible Controlled Assembly of Chitosan and Dextran sulfate: a new Synthetic Route towards Colloidal Polyelectrolyte Complexes.**

*M. Costalat,<sup>†</sup> L. David,<sup>†</sup> and T. Delair<sup>†</sup>*

<sup>†</sup> Ingénierie des Matériaux Polymères, Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5223 IMP, 15, Bd, A. Latarjet, Bât. Polytech, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Corresponding author information. E-mail: [thierry.Delair@univ-lyon1.fr](mailto:thierry.Delair@univ-lyon1.fr)

**ABSTRACT:** Colloidal polyelectrolyte complexes (PECs) were obtained by the controlled assembly of oppositely charged dextran sulfate and chitosan, at room temperature, in water and under moderate stirring. The control over the assembly process was achieved by the slow dialysis of the sodium chloride added to the polyelectrolyte solutions prior to mixing them. This method was carried out at high polymer concentrations of 1.5 wt % and 3 wt %, with screening salt concentrations (SSC) from 2 mol.L<sup>-1</sup> and chitosans of degree of acetylation (*DA*) from 39 % and above. The resulting particles featured a size distribution between 350-580 nm, a positive surface charge (30-58 mV) and remained stable for 40 days at 37°C. The reversibility of the controlled assembly was established by adding 2 mol.L<sup>-1</sup> NaCl to the dispersion, the particle solubilized and then re-formed upon dialysis of the salt.

**KEYWORDS:** Chitosan, Dextran sulfate, Colloids, reversible assembly, polyelectrolyte complexes.

## 1. Introduction

Polyelectrolyte complexes are formed by mixing aqueous solutions of oppositely charged polymers. This synthesis pathway can be regarded as a green formulation process because it takes place in water, at room temperature, without any organic solvent and with a limited energy input, in comparison with methods involving an emulsification step for instance. Polyelectrolyte complexation leads to a wide variety of materials ranging from soluble complexes<sup>1,2</sup>, through coacervates, which are complex rich liquid phases<sup>3</sup>, to precipitates<sup>4</sup> of various morphologies such as membranes, particles fibers, etc<sup>3</sup>. The morphologies of the precipitates arise from the control of the course of the assembly via a variety of parameters, like the respective charge density and degree of polymerization of the two counterparts<sup>5</sup>, the polymer concentration<sup>6</sup>, the positive to negative charge mixing ratio<sup>7</sup>, the polymer architecture<sup>8</sup>, the temperature<sup>4</sup> and ionic strength of the continuous phase<sup>2,9</sup> and, finally, the mode of processing<sup>10</sup>.

Polyelectrolyte complexes from polysaccharides have a wide potential of application in Life Sciences, e.g. as drug delivery systems<sup>11</sup>, imaging tools<sup>12</sup> or in tissue engineering<sup>13</sup>, because they are based on biosourced raw materials and formulated via a green process which, *à priori*, reinforce their safety profile. Among these new materials, colloidal polyelectrolyte complexes have received great attention as new tools for nanomedicine, using chitosan, a  $\beta$  (1->4) copolymer of glucosamine and N-acetyl glucosamine, the only naturally occurring polycation<sup>14</sup>. A great variety of anionic polysaccharides can form polyelectrolyte complexes in the colloidal size domain with chitosan, for example carboxymethyl cellulose<sup>15,16</sup>, alginates<sup>15</sup>, carboxymethyl konjac glucomannan<sup>17</sup>, hyaluronan and heparin<sup>18</sup> and dextran sulfate<sup>19</sup>.

The formation mechanism of chitosan-dextran sulfate colloidal polyelectrolyte complex was largely investigated: pH and ionic strength of the continuous phase, charge mixing ratio, respective molar mass of the polymer counterparts, the mode of addition were scrutinized<sup>6,20</sup>; the stoichiometry of the complexes was found different to a 1:1 charge neutralization and depended on the nature of the polymer used in excess<sup>21</sup>; intrinsic parameters of chitosan, i.e. molar mass and Degree of Acetylation (*DA*, corresponding to the molar fraction of N-acetyl groups in the polymer chain) had a strong impact on the colloidal stability of the nanocomplexes<sup>22</sup>. Interestingly, conversely to synthetic polymers, the chitosan - dextran sulfate

assemblies were irreversible, i.e. the complexes would not rearrange after the addition of an excess of one of the counterparts, as a result of the cooperative interactions of hydrogen bonding and hydrophobic interactions<sup>20</sup>. But in this process, irrespective of the nature of the poly anions, the polymer concentration during the nanocomplex forming process must be low, around 0.1% by weight. This can be explained considering that the complex formation, being kinetically controlled, dilution is the only way to limit the interchain cross-linking so as to remain within the colloidal domain. This may represent a limitation for the production of larger amounts of colloidal complex and may hinder the future development of this new family of colloidal materials. Here we report for the first time a new formulation for the synthesis of colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan, which addresses this shortcoming and which relies on the control over the polyelectrolyte chains interactions.

## 2. Experimental section

### 2.1. *Materials*

Chitosan obtained from chitin squid pens with a relatively high weight-average molar mass and low degree of acetylation (batch 113, DA ~1.5%, Mw ~ 532 000 g.mol<sup>-1</sup>) was purchased from Mahtani chitosan Pvt. Ltd. Prior to use, the polymer was purified by dissolving it at 0.5 % (w/v) in a stoichiometric amount of aqueous acetic acid and by filtering the resulting solution successively on membranes (Millipore) of porosity: 3, 1.2, 0.8 and 0.45 µm. Then, the polymer was precipitated with aqueous ammonia until pH 9-10. After repeated washings with de-ionized water, the neutral precipitate was freeze-dried.

The resulting chitosan purified, with a low content of GlcNAc units was N-acetylated to obtain a homogeneous series of samples of different *DAs*. The reaction was performed under soft conditions in a fresh solution of acetic anhydride in a water/propanediol mixture (50%/50% w/w) thus allowing the preservation of a statistical distribution of residues within the chains and the only acylation of amine functions according to Vachoud and al<sup>23</sup>. The products were isolated by precipitation on adding aqueous ammonia followed by repeated washings with de-ionized water, then freeze-dried.

Finally, hydrolysis<sup>6</sup> by controlled nitrous deamination was performed to produce low molar weight polymers. Chitosans were dissolved at 0.5% (w/v) in a 0.2M acetic acid/0.15 M sodium acetate buffer. A 1 g.L<sup>-1</sup> sodium nitrite was added to chitosan solutions to obtain a nitrite/glucosamine units molar ratio of 0.1. The reaction was performed under high mechanical stirring for various times. Low molar mass chitosans were recovered by precipitation with ammonia till pH 9-10, followed by repeated washings with deionized water until neutrality and finally lyophilized.

Dextran sulfate was purchased from Sigma Aldrich and was used without further purification. The water content was determined by thermogravimetric analysis (TA Instrument TGA Q500). The molecular characteristics were determined by gel permeation chromatography, according to Schatz et al<sup>6</sup>. The degree of sulfation (the number of sulfate functions per glucosidic unit) was 2.2, as determined by colloidal titration using toluidine blue<sup>24</sup>.

## **2.2. Methods.**

### **2.2.1. Characterization of chitosan**

The degree of acetylation was determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy (Brucker Avance III 400 MHz) at 25°C. Samples were prepared by dissolving 10 mg of chitosan in 1mL of D2O and 5 µl of HCl. The *DA* value was calculated according to the Hirai et al method.

The water content was determined by thermogravimetric analysis (TA Instrument TGA Q500). The weight average molar mass *M<sub>w</sub>* and the polydispersity indexes (*I<sub>p</sub>*) were measured by size exclusion chromatography (2500 and 6000 PW TSK gel columns from Tosohaas) coupled on-line with a differential refractometer (Wyatt Optilab T-rEx) and a multiangle laser light scattering detector (Wyatt Dawn EOS) operating at  $\lambda = 633$  nm. A degassed 0.2 M acetic acid/0.15M ammonium acetate buffer with a pH 4.5 was used as the eluent. The flow rate was maintained at 0.5 ml/min. The refractive index increments (*dn/dc*) were added independently for each degree of acetylation according to a previous study<sup>25</sup>. The physicochemical parameters of the chitosan samples are reported in Table 1.

**Table 1.** Physicochemical parameters of Chitosans determined by  $^1\text{H}$  NMR and SEC in an acetic acid/Ammonium Acetate buffer (pH 4.5)

DA (%)	Mw $\times 10^5$ (g.mol $^{-1}$ )	Ip
1.5	4.80 $\pm$ 0.05	1.8 $\pm$ 0.02
9	4.46 $\pm$ 0.05	1.7 $\pm$ 0.02
	2.73 $\pm$ 0.02	1.5 $\pm$ 0.01
	2.25 $\pm$ 0.02	1.5 $\pm$ 0.02
	0.76 $\pm$ 0.001	1.3 $\pm$ 0.02
	0.24 $\pm$ 0.001	1.2 $\pm$ 0.02
19	4.32 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.02
	3.08 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.02
	2.87 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.02
	1.07 $\pm$ 0.01	1.4 $\pm$ 0.02
	0.33 $\pm$ 0.02	1.2 $\pm$ 0.02
26	3.59 $\pm$ 0.05	1.7 $\pm$ 0.04
	3.24 $\pm$ 0.03	1.7 $\pm$ 0.02
	2.78 $\pm$ 0.04	1.6 $\pm$ 0.05
	1.02 $\pm$ 0.01	1.4 $\pm$ 0.04
	0.37 $\pm$ 0.003	1.3 $\pm$ 0.02
27	4.96 $\pm$ 0.06	1.6 $\pm$ 0.05
	3.14 $\pm$ 0.08	1.6 $\pm$ 0.07
	1.04 $\pm$ 0.07	1.3 $\pm$ 0.02
	0.32 $\pm$ 0.01	1.2 $\pm$ 0.06
32	4.33 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.05
33	4.83 $\pm$ 0.06	1.5 $\pm$ 0.04
39	4.58 $\pm$ 0.05	1.7 $\pm$ 0.05
	3.51 $\pm$ 0.03	1.7 $\pm$ 0.02
	3.00 $\pm$ 0.02	1.6 $\pm$ 0.02
	1.33 $\pm$ 0.03	1.4 $\pm$ 0.05
	0.52 $\pm$ 0.06	1.2 $\pm$ 0.1
47	3.96 $\pm$ 0.04	1.7 $\pm$ 0.03
	1.88 $\pm$ 0.04	1.7 $\pm$ 0.05
	1.49 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.08
	0.52 $\pm$ 0.02	1.2 $\pm$ 0.06
50	4.62 $\pm$ 0.09	1.6 $\pm$ 0.03
	3.04 $\pm$ 0.04	1.6 $\pm$ 0.03
	2.73 $\pm$ 0.04	1.6 $\pm$ 0.04
	1.78 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.04
	0.74 $\pm$ 0.001	1.3 $\pm$ 0.02



### **2.2.2. Preparation of polyelectrolytes solutions in presence of different sodium chloride concentrations**

Taking into account the initial water content, chitosan was dispersed at various concentrations with a stoichiometric amount of aqueous acetic acid with respect to the free amines group for each chosen degree of acetylation. Dissolution was achieved after overnight stirring. Then, sodium chloride was added to each solution to obtain the expected concentration. Dextran sulfate solutions, at different concentration were prepared in deionized water. Sodium chloride was also added to obtain the same concentration as in chitosan solutions. Then polyelectrolytes and sodium chloride were mixed and stirred for two hours.

### **2.2.3. Polyelectrolytes solubility in salt solution**

The solubility of the polyelectrolytes in presence of different concentration of sodium chloride was characterized by absorbance measurement at  $\lambda = 400$  nm with an UV/Vis spectrometer (Perkin Elmer Instruments Lambda 35). At this wavelength chitosan and dextran sulfate did not absorb. Deionized water was used to establish the baseline. Absorbance values were expressed as the average of three independent measurements.

### **2.2.4. Chitosan intrinsic viscosity**

Various chitosan solutions were prepared as above. Then, these solutions were filtered through  $0.45\ \mu\text{m}$  and injected into an Ubbelohde tube capillary viscometer (Viscologic TI.1, SEMATech) with an inner diameter of  $0.53\ \text{mm}$  and equipped with an automatic dilution ( $\pm 0.05\%$ ). Measurements were achieved at  $25^\circ\text{C}$  using deionized water and acetic acid and sodium chloride (with the same proportion as in the solution of chitosan) as reference to establish the viscosity of the pure solvent. The intrinsic viscosities were determined by extrapolating the reduced viscosity to zero concentration.

### 2.2.5. Small angle X-ray scattering

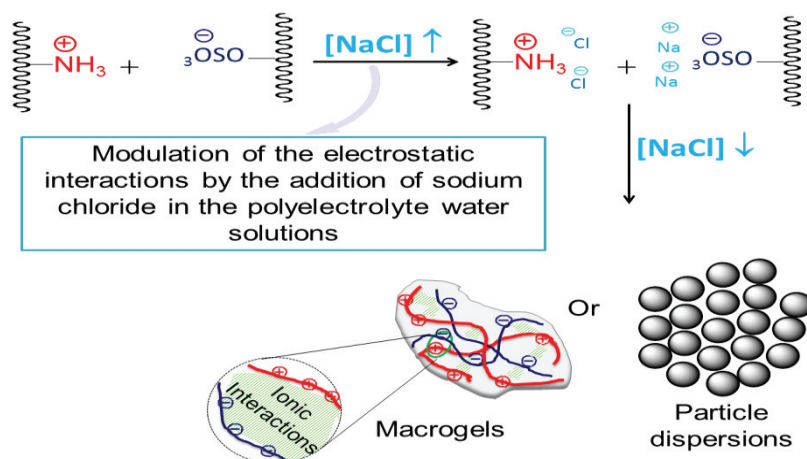
Small angle X-ray scattering (SAXS) experiment was performed at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) on the line BM2-D2AM. Chitosan (0.25% (w/v)) dispersed in salt solution (0, 2, and 6 M) obtained as described above, were put in cylindrical sample holders (internal diameter of 5 mm). The contribution of the cell and the solvent formed by salt solution without chitosan (0, 2 and 6M) were subtracted from the scattering curve of each samples studied.

### 2.2.6. Polyelectrolyte complex formation by controlled association

The method is summarized in Figure 1. Various concentrations of chitosan samples soluble at all salt concentration were prepared in deionized water as above. The pH was adjusted to 4.0 with 0.1M acetic acid or 0.1M sodium hydroxide. Then, sodium chloride was added at various concentrations to screen the polyelectrolyte charge by chloride ions. Dextran sulfate solutions, at different concentrations were prepared directly in deionized water, pH was adjusted to 4.0 and sodium chloride was added at the appropriate concentrations.

Appropriate volumes of the above solutions were mixed so as to the charge mixing ration  $R=2$  ( $n^+/n^-$  molar mixing ratios between cationic and anionic charges) under a constant magnetic stirring of 800 rpm. This solution was then dialyzed against deionized water (Spectra/Por® membrane, MWCO = 3,500 g.mol<sup>-1</sup>) to progressively eliminate sodium chloride. The dialysis bath ( $V= 100$  times the volumes of the polymer solution) was changed every hour during the three first hours. It was then changed every two hours until the end of the dialysis duration (16 hr).

Another dialysis method was used, called here 'soft dialysis'. Instead of using water the dialysis bath contained 500 mmol.L<sup>-1</sup> salt. This salt concentration was then decreased by half every hour at the time of water changing to reach a zero concentration. The end of dialysis was realized as previously described.



**Figure 1.** Polyelectrolyte complexation process by controlled association.

### 2.2.7. Dialysis kinetics

The chloride ions content was monitored with time by potentiometric titration (TitraLab TIM865, Radiometer Analytical) using a 0.1N  $\text{AgNO}_3$  as titrant and two or three nitric acid drops to avoid the formation of metallic hydroxide. The end of dialysis was determined by the absence of chloride ions in the water of the dialysis bath.

### 2.2.8. Physicochemical characterization of the complex dispersions

#### 2.2.8.1. Particle solid contents

Particles were separated from the aqueous phase by centrifugation at 23 000 g for 1 hour. The supernatant was carefully discarded, and the pellet was dried at 60°C overnight. The solid content was defined by the ratio between the dried particle weights to the weight of the dispersion.

#### 2.2.8.2. *Quasi-elastic light scattering*

Dynamic light scattering measurements were performed on a Malvern Zetasizer ZS equipped with a 5 mW He/Ne laser beam operated at  $\lambda = 633$  nm and at  $173^\circ$  scattering angle. The self-correlation function was expanded in a power series (Cumulants method). Size values are the average of 3 series of five measurements obtained at  $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .

#### 2.2.8.3. *Electrophoretic mobilities*

The electrophoretic mobilities were determined at  $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  with a Malvern Zetasizer ZS equipped with a 5 mW He/Ne laser at  $\lambda = 632.8$  nm. The electrophoretic mobility was expressed as the average of ten measurements. Before measurement, particles were dispersed in deionized water.

#### 2.2.8.4. *Transmission electron microscopy*

Morphology and the shape of chitosan-dextran sulfate particles were examined using transmission electron microscopy (PHILIPS CM120). A droplet of 0.01% (v/v) particle dispersion was deposited on a copper grid covered with carbon film. The excess water was removed by blotting with filter paper, and then air dried at room temperature. The observation was occurred using an accelerating voltage of 80 kV.

#### 2.2.8.5. *Cryo-Transmission electron microscopy*

For cryo-TEM experiments, a droplet of 1.5% (w/v) particle dispersion was put on an advanced holey carbon film coated on copper grid. The excess water was removed by blotting with filter paper and subsequently the grid was vitrified by plunging it into liquid ethane cooled by liquid nitrogen thus forming a thin film of solid amorphous water. The cryo holder was then transferred into the vacuum column of TEM microscope (PHILIPS CM120) maintained at liquid

nitrogen temperature for the observation at 120 kV voltages. Both TEM and Cryo-TEM experiments were carried out at the Centre Technologique des Microstructures - Université Claude Bernard Lyon 1.

### **2.2.9. Reversibility of the controlled polyelectrolyte complexation method**

To study the reversibility of the controlled complexation method, salt was added to the particles dispersions to obtain various concentrations. For particular salt contents, clear solutions were obtained and then, they were dialyzed as previously described to form complex particles once again. This operation was repeated several times to study the impact of this reversibility on particles sizes.

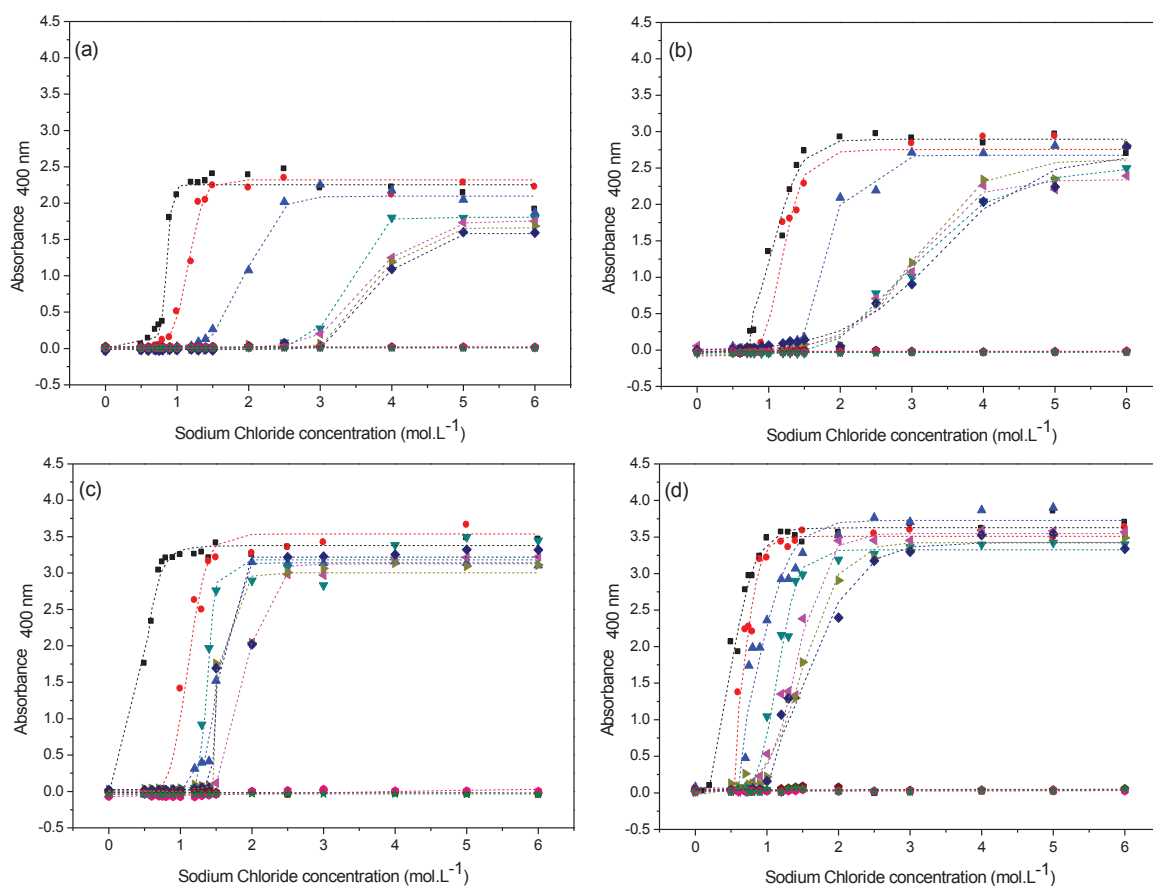
## **3. Results and discussion**

The control over the complexation of the two polyelectrolytes was achieved by adding a low molecular weight electrolyte at a concentration that enabled total charge screening. First, the impact of the presence of salt on the water solubility of chitosan and on the conformation of the polymer was investigated.

### **3.1. Impact of salt concentration on the water solubility of chitosan. Effects of *DA*, polymer concentration and chitosan Mw.**

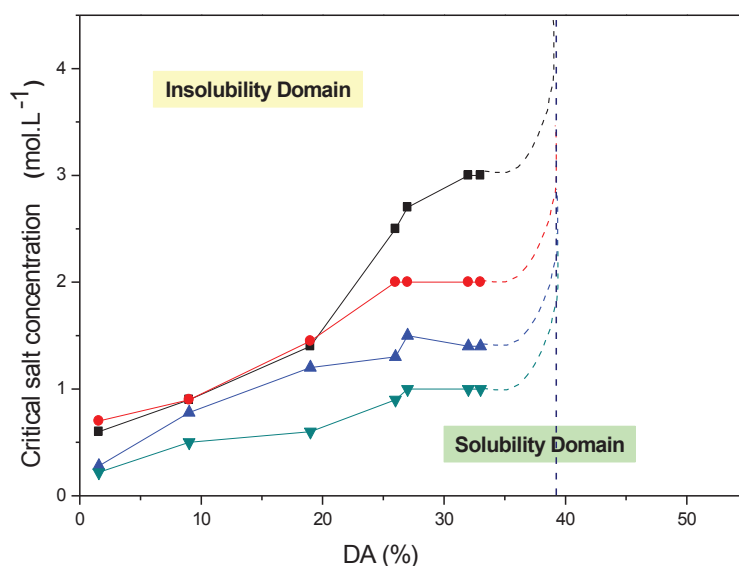
For this investigation a large variety of chitosan samples were synthesized, whose degrees of acetylation and molar masses are reported in Table 1. Chitosan solutions of varying ionic strength were prepared and the solubility was checked by measuring the absorbance. At low salt concentration each solution was homogenous, but on increasing the NaCl concentration, a desolvation of the polymer took place at a critical NaCl concentration, depending on the intrinsic properties of chitosan and also the polymer concentration in solution.

In Figure 2 and 1 - SD are reported the absorbance variations with increasing salt concentrations for various DAs and polymer concentrations, for a fixed molar mass of  $400 \text{ kg.mol}^{-1}$  (Figure 2) and at constant concentration (0.5% (w/v)) but with varying molar masses (Figure 1 - SD). For a critical salt concentration ( $C_c$ ), the absorbance sharply increased to a plateau value, which corresponded to the total precipitation of the polymer. Three major observations can be made from these Figures 2 & 1 - SD: i) first, there is a limit value in  $DA$ ,  $DA=39\%$ , above which chitosan remained soluble irrespective of the salt concentration; ii) second, the value of the critical salt concentration decreased with increasing polymer concentration; iii) third the molar mass of chitosan had a limited impact on the value of the this critical concentration.



**Figure 2.** Absorbances ( $\lambda = 400 \text{ nm}$ ) of chitosan solutions as a function of NaCl concentration for a fixed molar mass (ca 400 000 g/mol), at various polymer concentration and degree of acetylation : (a) CS 0.25%, (b) CS 0.5%, (c) CS 1.5%, (d) CS 3%. ■  $DA = 1.5\%$ , ●  $DA = 9\%$ , ▲  $DA = 19\%$ , ▼  $DA = 26\%$ , ▼  $DA = 27\%$ , ►  $DA = 32\%$ , ◆  $DA = 33\%$ , ◆  $DA = 39\%$ , ●  $DA = 47\%$ , ★  $DA = 50\%$ .

The existence of a limit  $DA$  of 39% above which chitosan remained soluble (see Figure 1-SD of supplementary Data) can be related to its solution properties described in the law of behavior of chitosan solutions<sup>25</sup>. At low  $DA$ , chitosan is a polyelectrolyte due to the protonation of the amine groups and the solubility of the polymer chain depend on the existence of electrostatic repulsive forces that repel the polymer chain from one another and expand the polymer chain. Screening these electrostatic forces favor the inter or intra chain interactions via hydrogen bonding, hence the observed desolvation process. At higher  $DA$ s, the electrostatic charge density on the polymer chains decreased to the profit of polar N-acetyl groups, capable of hydrogen bonds with water. Hydrogen bonding is less sensitive to ionic strength and so the polymer remains soluble at high salt concentration. This is confirmed by the fact that the critical salt concentration increased with  $DA$ , at constant molar mass (Figure 3). Interestingly, the increase in  $C_c$  is sharp till  $DA = 25\%$  and then plateaued till 39%. This change in slope can be related to the difference in behavior of chitosan in solution, a strong polyelectrolyte below  $DA$  25% dominated by electrostatic interactions, and a mixed behavior above, where electrostatic effects are counterbalanced by Van der Waals interactions, in accordance with the law of behavior<sup>25</sup>.



**Figure 3.** Solubility diagram of chitosan as a function of  $DA$ , for salt concentration:

(■)  $CS = 0.25\%$  (w/v), (●)  $CS = 0.5\%$  (w/v), (▲)  $CS = 1.5\%$  (w/v), (▼)  $CS = 3\%$  (w/v).

As would be expected,  $C_c$  decreased with increasing concentration of chitosan in solutions and the effect was more marked at higher  $DA$ s than at lower  $DA$ s for which electrostatic effects predominated and the polymer precipitated out at low salt concentrations. More unexpectedly was the lack of effect of molar mass on the value of the critical salt concentration. As seen from figure 1-SD, the onset of the phase separation was identical for each molar mass for a set value of  $DA$ . Similarly, the  $DA$  limit value at which chitosan samples remained soluble irrespective of the salt content in the aqueous phase  $DA=39\%$ , was independent of the degree of polymerization of the chitosan chains.

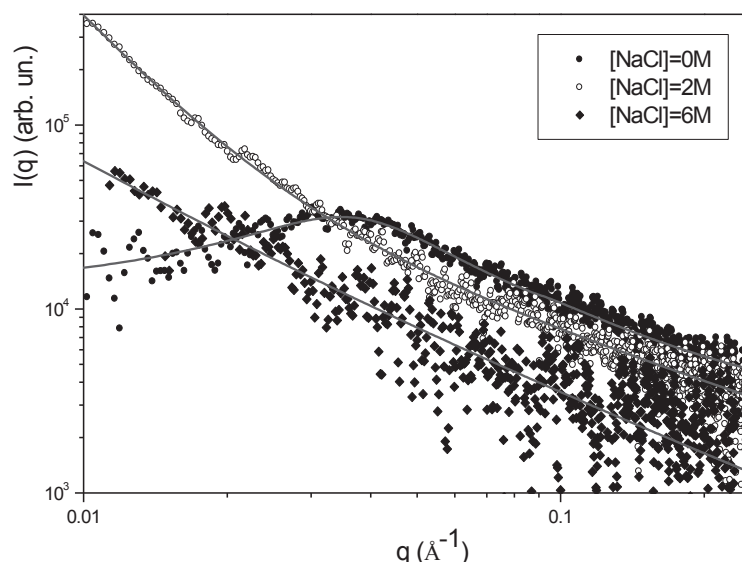
In contrast to chitosan, dextran sulfate samples remained soluble for each salt concentration and molar mass, in the investigated concentration range (Figure 2-SD of Supplementary Data). This behavior can be attributed to the high flexibility of the dextran chains imparted by the  $\alpha 1 \rightarrow 6$  glycosidic bond to the high degree of substitution of dextran sulfate ( $DS=2.2$ )

The effect of the screening of electrostatic interactions on the conformation of chitosan in solution can be viewed at the macroscopic level on the value of the intrinsic viscosity of chitosan as a function of the ionic strength, expressed in NaCl concentration. With increasing salt concentration in water, the viscosity dropped sharply to level off for a salt concentration of  $1 \text{ mol.l}^{-1}$ , suggesting that this concentration would be sufficient to screen electrostatic interactions (Figure 3-SD). Interestingly, the lower the  $DA$ , the lower the intrinsic viscosities (see insert of Figure 3-SD-a), which is correlated to the polyelectrolyte nature of chitosans of low  $DA$ s, for which electrostatic interactions predominate. The effect of the degree of polymerization of chitosan can be observed in the insert of Figure 3-SD-b, where the intrinsic viscosity of the lower molar mass chitosan is lower than for the higher one, as would be expected. Clearly, the behavior of chitosan is greatly dependent on the molar fraction of N-acetyl groups in the polymer chain, similarly to its solubility as a function of the electrolyte concentration.

The Small Angle X-ray scattering data of Figure 4 confirmed the change in nature of the solutions, the polyelectrolyte peak detected in the absence of salt, corresponding to an order due to electrostatic interactions<sup>26,27</sup>, was no longer well detected in the presence of 2 and 6  $\text{mol.l}^{-1}$  sodium chloride. For these salt concentrations, at low  $q$  values, one can observe the presence of



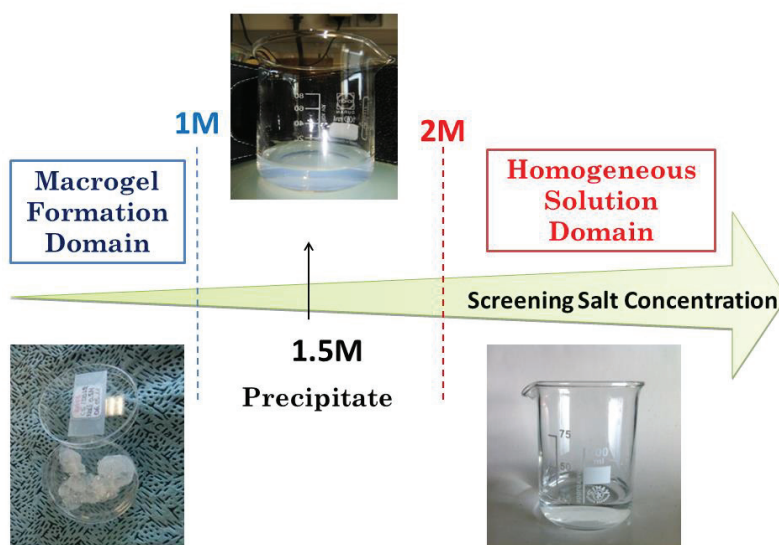
macromolecular aggregates as described by Popa-Nita et al.<sup>28</sup>. The difference in signal intensity for the 2 and 6 mol.L<sup>-1</sup> sodium chloride solutions was due the attenuation from chloride ions.



**Figure 4.** The evolution of  $I(q)$  detected with chitosan solution at 0.25% (DA 50%) and different salt concentrations.

### 3.2. Conditions of the complexation process by controlled assembly

The mixing of the chitosan and the dextran sulfate solutions at increasing salt concentrations lead to a macrogel for salt concentrations lower than 1 mol.L<sup>-1</sup>, or dispersed precipitates for a concentration range of 1 to 2 mol.L<sup>-1</sup> (Figure 5). For a salt content of 2 mol.L<sup>-1</sup> and higher, the solutions remained homogenous without any phase separation. Hence, to achieve a screening of the electrostatic interactions sufficient enough to prevent phase separation, at least a 2 mol.L<sup>-1</sup> NaCl concentration was required. This salt concentration is higher than that required for the assembly of inorganic nanoparticles with macromolecules as reported by Fresnais et al.<sup>29,30</sup>. This difference can be attributed to the difference in starting materials, these investigators used nanoparticles and synthetic polymers whose nature of electrostatic charges was quite different than ours and, also, the hydrocarbon backbone of their macromolecules was more flexible than the  $\beta$ , 1- $\rightarrow$  4 glycosidic bond of chitosan.

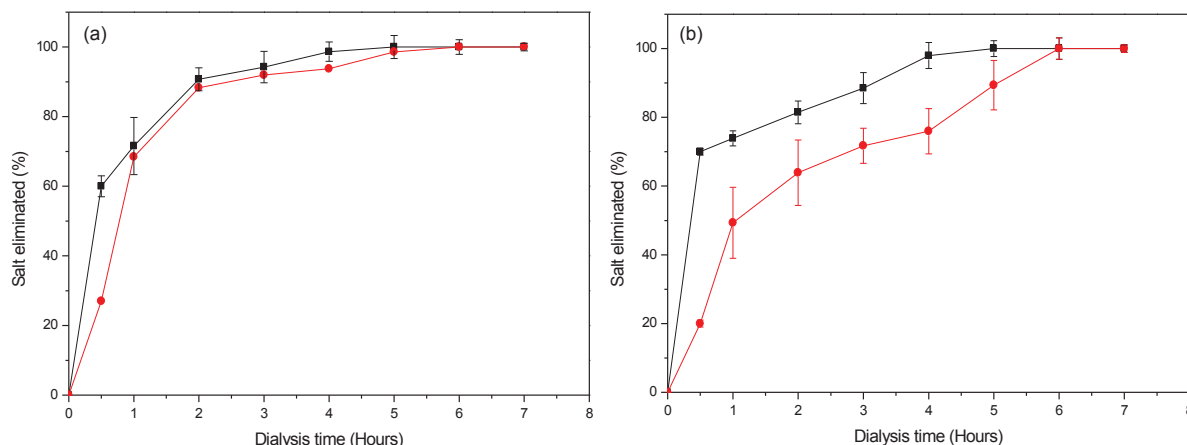


**Figure 5.** Effect of the sodium chloride concentration on the mixing of chitosan and dextran sulfate solutions.

### 3.3. Formation of polyelectrolytes complexes dispersions

The homogenous mixtures were dialyzed against deionized water and the monitoring of the release of the chloride ions was achieved by conductometric titration using silver nitrate and a silver specific electrode. The kinetics of the chloride elimination was moderately impacted by the salt concentration as seen in Figure 6a, as 100% of chloride ions were eliminated in 5 or 6 hrs for starting concentrations in sodium chloride of 2 or 6 mol.L<sup>-1</sup> respectively.

An increase in the chitosan concentration of the solution to be dialysed resulted in an increase in dialysis time to reach 100% elimination of chloride ions (compare Figure 6a and 6b) for the 6 mol.L<sup>-1</sup> NaCl concentration and to a lesser extend for the 2 mol.L<sup>-1</sup> concentration. The increase in viscosity of the chitosan solutions with increasing polymer concentration can account for this observation.



**Figure 6.** Dialysis kinetics by monitoring the concentration of released chloride ions. Polymer concentration (a) 1.5% and (b) 3%. ■  $\text{NaCl} = 2 \text{ mol.L}^{-1}$ , ●  $\text{NaCl} = 6 \text{ mol.L}^{-1}$ .

The controlled complexation process between chitosan and dextran sulfate was shown to be reversible, on adding to a colloidal dispersion the appropriate amount of sodium chloride to reach a salt concentration of  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ , the particles re-dissolved to a limpid solution (Figure 5-SD). Dialysing this solution against water provided, again, a colloidal dispersion of polyelectrolyte complex.

In Table 2 we show the results on the reversibility of the process and the impact of the number of re-dissolution / re-dialysis cycles on particle sizes, for a salt concentration used for re-dissolution ranging from 2 to  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  and for two chitosan concentrations 1.5% and 3%. First, it is worth noting that, on increasing the sodium chloride concentration for screening, the particle size decreased as a result of a slower kinetics of ion pair association, favoring a more compact conformational adaptation of the macromolecules. After three dissolution /dialysis cycles, the particle size stabilized around 300 nm, suggesting that after synthesis the particles were not stable thermodynamically and could undergo rearrangements. Going through these three cycles, particle zeta potential also decreased, suggesting that the compaction of the particles resulted from a higher level of charge neutralization by ion pairing. We will come back to that kinetics versus thermodynamic control of particles size in section 3.4 in this paper. Anyhow, one can conclude that the particle formation process is totally reversible.

**Table 2.** Process reversibility: size and surface charge of chitosan/dextran sulfate nanoparticles obtained after up to three dissolution/dialysis cycles.

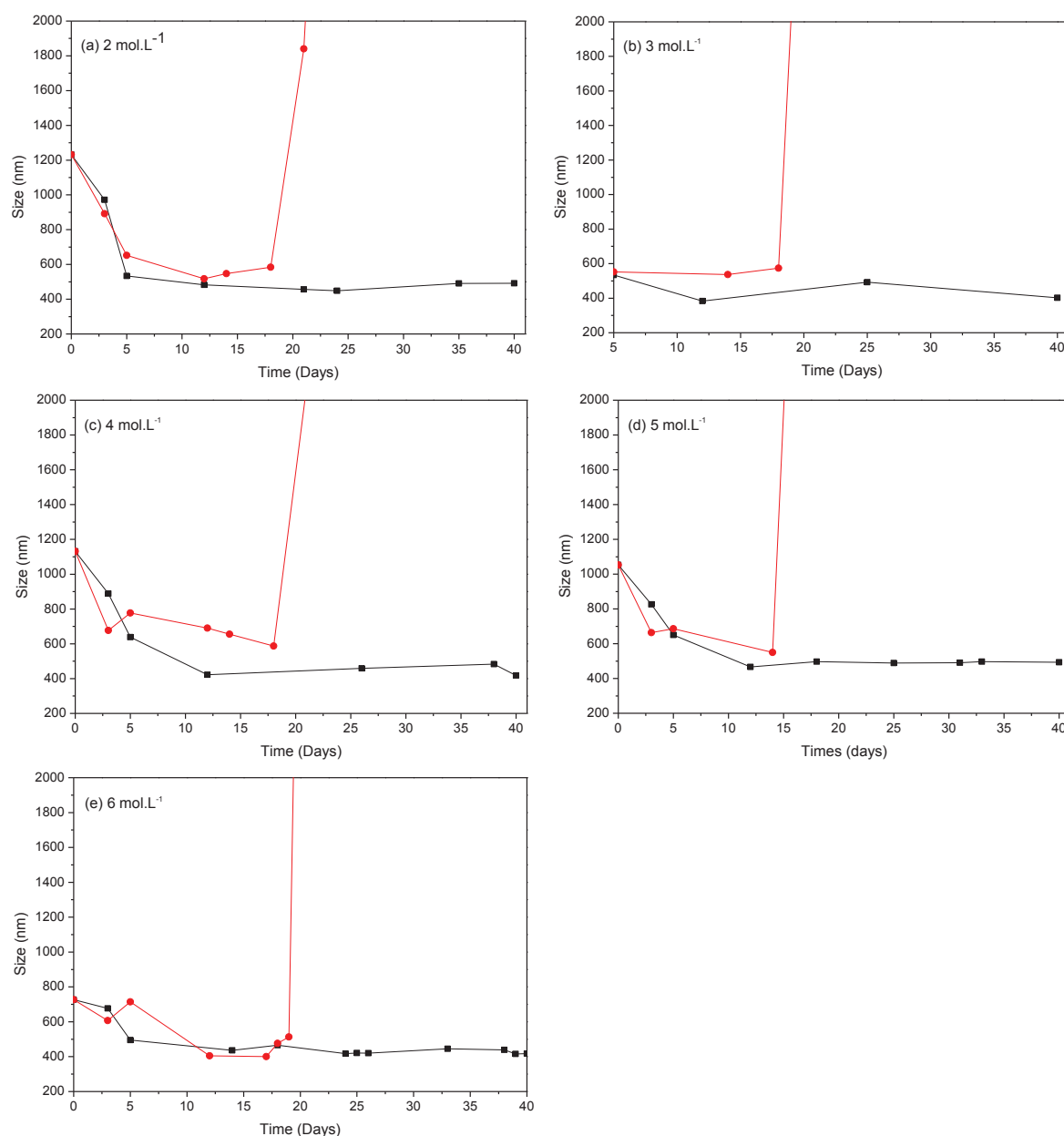
<b>Particles at 1.5% solid content</b>				
Dissolution/dialysis Cycle*	CDS** (mol.L <sup>-1</sup> )	Size (nm)	PI	Zeta Potential (mV)
0	2	1152	0.2	+53
	3	1128	0.2	+54
	4	1069	0.2	+55
	5	1022	0.2	+52
	6	743	0.1	+55
1	2	565	0.2	+38
	3	531	0.2	+38
	4	399	0.2	+39
	5	355	0.2	+37
	6	325	0.1	+33
2	2	489	0.2	+34
	3	347	0.1	+33
	4	333	0.1	+32
	5	343	0.1	+22
	6	350	0.1	+22
3	2	315	0.1	+27
	3	313	0.1	+23
	4	321	0.1	+20
	5	338	0.1	+22
	6	298	0.1	+23
<b>Particles at 3% solid content</b>				
0	2	1593	0.2	+58
	3	1524	0.2	+55
	4	1265	0.2	+55
	5	1226	0.2	+57
	6	1018	0.1	+57
1	2	930	0.2	+53
	3	848	0.2	+54
	4	722	0.2	+54
	5	678	0.2	+55
	6	734	0.2	+56
2	2	839	0.2	+47
	3	559	0.2	+47
	4	453	0.2	+45
	5	265	0.1	+48
	6	259	0.1	+38
3	2	685	0.2	+47
	3	483	0.2	+47
	4	314	0.2	+46
	5	258	0.1	+47
	6	251	0.1	+42

\*Cycle 0 means particles formed for the first time by mixing polysaccharide solutions and dialysis. \*\*CDS, complex dissociating salt

### 3.4. Colloidal characterization of the complexes and colloidal stability

Particle sizes were measured after dialysis and after storing in deionized water (Figure 6-SD) or in a 50 mmol.L<sup>-1</sup> sodium chloride aqueous solution (Figure 7) at 37°C or room temperature. The dispersions were obtained by dialysis of mixtures containing from 2 mol.L<sup>-1</sup> to 6 mol.L<sup>-1</sup> sodium chloride. The observed general trend was a decrease in particle size from  $t=0$ , i.e. after dialysis, and  $t=5$  days or more, depending on the storing conditions. In water, storing the particles at 37°C lead to smaller particle sizes than at room temperature, though the effect was less marked as the initial salt concentration before dialysis increased, and for 6 mol.L<sup>-1</sup> the two curves superimposed. When the dispersions were stored in the presence of 50 mmol.L<sup>-1</sup> sodium chloride, the particles had similar sizes, irrespective of the storing temperature but, after 15 to 20 days at room temperature, the particles aggregated irreversibly, whereas they remained stable at 37°C.

These results show that the objects resulting from the controlled charged neutralization were not at equilibrium after dialysis and could undergo reorganizations. In the absence of salt in the storing medium, the reorganization was slower, or more limited in range, at room temperature than at 37°C. In the presence of salt, the reorganizations seemed to occur at similar rates for both temperatures till the flocculation took place at days 15- 20 for dispersions stored at room temperature. These reorganizations suppose the destruction of some ion pairs, earlier formed in the elaboration process, and the formation of new ones leading to more compact complexes. In these new structures, the macromolecules underwent conformational adaptation to increase the charge neutralization within the complexes. The conformational adaptation was favored by an energy input and also by a partial screening of electrostatic interaction with salt. This screening increased the reversibility of the ion-pairing process, selecting the ion-pairs associated with less steric constraints. The systematic flocculation observed at room temperature after 15 to 20 days of storing is not yet fully understood. Nevertheless, it can be attributed to interfacial reorganizations of the polymer chains, theses conformational rearrangements leading to a loss of colloidal stability. At 37°C, one can speculate that the increased chain mobility prevented such a reorganization to occur so, the interfacial chitosan chains could still ensure the electrosteric stability of the colloids.



**Figure 7.** Colloidal stability over time for dispersions stored in a 50 mmol.L<sup>-1</sup> aqueous solution (solid content= 1.5%) ■ 37°C; ● RT.

In the preceding experiment we did not report any storing at +4°C because at this temperature, particles aggregated very quickly, see table 3a). But, for further applications in Life Sciences, in which these particles will be associated with temperature labile biological molecules, it will be essential to store them at +4°C. To this end, we modified the dialysis procedure to slow down the desalting process: in the dialysis bath, we substituted deionized water by a solution containing 500 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl. Moreover, this salt concentration was decreased by half every

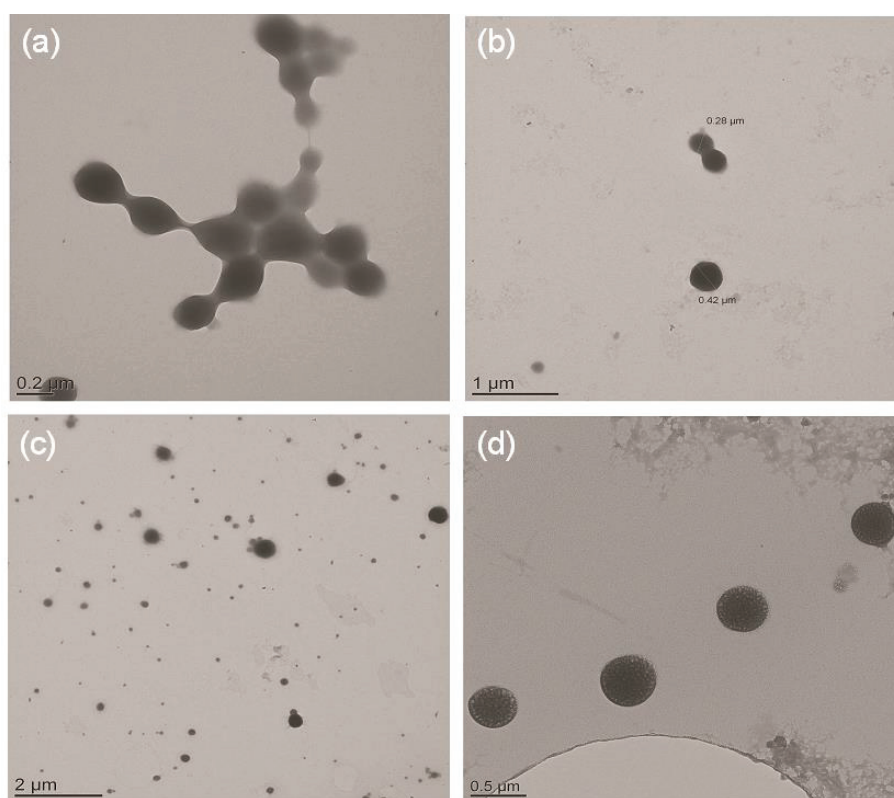
hour to reach a zero concentration. The particles obtained by this ‘soft dialysis’ technique (‘soft’ because the desalting kinetics of the polyelectrolyte solution was slower than when de-ionized water was used from the start of the process) were colloidally stable up to 2 years when stored at +4°C, as reported in Table 3b). These results confirm that the control of the kinetics of salt elimination is a key factor, greatly impacting the properties of the final colloids. This is consistent with our results reported in Figures 6-SD and 7 which showed that the kinetically obtained objects could re-organize into more stable assemblies. Data in Table 3b) also confirm that i) particles after synthesis had a large average size and reorganized with time into smaller objects; ii) particles obtained with 6 mol.L<sup>-1</sup> sodium chloride were more compact than those obtained from 2 mol.L<sup>-1</sup>, the differences being less marked with

**Table 3.** Size and surface charge of particles dispersed in water and stored at +4°C as function of dialysis method used: dialysis against water and soft dialysis. (Chitosan DA 49%, Mw 133000 g.mol<sup>-1</sup>; dextran sulfate Mw  $12.86 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup> and sulfate content 2.1).

<b>a) Particles obtained by dialysis against deionized water</b>									
SSC (mol.L <sup>-1</sup> )	Time:		Day 0			Day 10			2 years
	Size (nm)	PI	Zeta Potential (mV)		(nm)	PI	(mV)	(nm)	PI (mV)
PSC 1.5%									
2	1144	0.2	+54		Flocculation			-	- -
6	727	0.2	+58		Flocculation			-	- -
PSC 3%									
2	1292	0.2	+51		Flocculation			-	- -
6	968	0.2	+61		Flocculation			-	- -
<b>b) Particles obtained by soft dialysis</b>									
SSC (mol.L <sup>-1</sup> )	Time:		Day 0			Day 10			2 years
	Size (nm)	PI	Zeta Potential (mV)		Size (nm)	PI	Zeta Potential (mV)	Size (nm)	PI Zeta Potential (mV)
PSC 1.5%									
2	1285	0.2	+52		477	0.2	+54	579	0.2 +55
6	1260	0.2	+55		324	0.1	+54	549	0.1 +55
PSC 3%									
2	1526	0.2	+55		919	0.2	+59	567	0.2 +46
6	1423	0.1	+55		613	0.2	+59	544	0.2 +46

PSC, particles solid content

The spherical morphology of the colloidal complexes was confirmed by two different microscopy techniques, namely transmission electron microscopy and cryo-transmission electron microscopy (Figure 8). Figures 8a shows particles obtained before the reorganization process was complete, the particles were associated to another one. In Figure 8b and c, we clearly observed the reorganization that took place overtime for two different solid contents: the colloid assemblies appeared as single particles throughout the samples. In order to reduce the impact sample preparation on the morphology of the particles, the same colloid suspensions were analyzed by cryo-transmission electron microscopy, Figures 8d, confirming the spherical shape of the objects. However, upon exposure to the electron beam, the particles quickly degraded which explains the non-uniformity of the particle internal structure.



**Figure 8.** Transmission electron microphotography of particles in water obtained from 1.5% on solid content (a) 5 days after dialysis, (b) 15 days after dialysis, and (c) from 3% of solid content after stabilization. (d) Cryo-Transmission electron microphotography at 1.5% of solid content. (Chitosan  $DA$  49%,  $M_w$  130, 000  $g \cdot mol^{-1}$ ;  $DS$   $M_w$   $12.86 \times 10^5$   $g \cdot mol^{-1}$  and sulfate content 2.2).



## Conclusion

Colloidal polyelectrolyte complexes were obtained via a controlled assembly process, based on the screening of electrostatic interactions between oppositely charged polysaccharides using an adequate concentration of electrolyte in the medium.

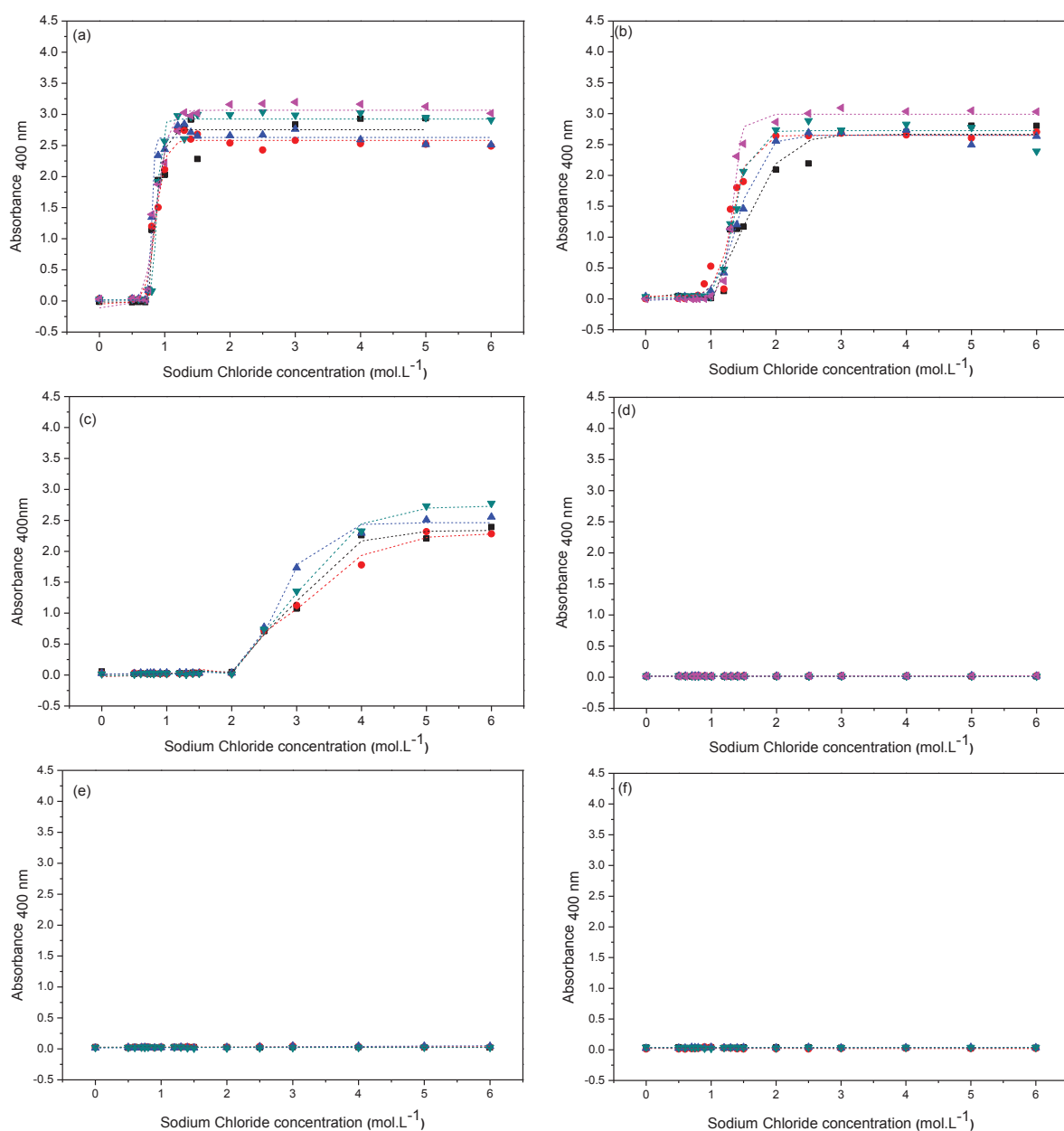
The presence of salt in the chitosan solution induced a desolvation of the polymer at a critical salt concentration ( $C_c$ ), whose value was directly impacted by the degree of acetylation of chitosan. We evidenced a limit  $DA$  of 39% above which chitosan remained soluble, whatever the electrolyte concentration. The impact of the N-acetyl groups content on the water solubility of chitosan in the presence of salt was attributed to i) the charge density decreased, with increasing  $DA$ , hence reducing the polyelectrolyte character of the macromolecules, ii) a concomitant increase in the polarity of the macromolecules favoring its capability at forming hydrogen bonds with water. In contrast, dextran sulfate remained soluble, irrespective of the salt concentration. These differences in behavior were attributed to macromolecular characteristics of the poly ions: a flexible  $\alpha$ 1- $\rightarrow$ 6 dextran sulfate with a degree of substitution of 2.2 and a rigid  $\beta$  1- $\rightarrow$ 4 chitosan, prone to associate inter molecularly by hydrogen bonding.

Mixing of the polyelectrolyte solutions at a salt concentration of 2 mol.L<sup>-1</sup> or higher, yielded a homogenous liquid phase which upon dialysis against water could allow the self-assembly of the polyelectrolytes into colloidal particles of dextran sulfate-chitosan complexes. This complexation process was shown to be reversible, adding to the dispersions sodium chloride up to 2 mol.L<sup>-1</sup>, the particles re-dissolved to a limpid solution.

The colloidal complexes obtained from this controlled process underwent macromolecular reorganizations over time, leading to more compact particles. The variations in colloidal stability with the external parameters like temperature and salt concentration were attributed to the reversibility of these associations. One of the most important conclusions of this work is that it is essential to decrease the kinetic control of the particle formation process to favor, using high salt concentration and slow dialysis kinetics, a thermodynamically controlled process. Further work will address the evaluation of i) the scope of this process versus other polyanions; ii) the interfacial functionalization of these nano complexes with proteins or ligands for drug targeting of vaccine delivery; iii) the loading of these colloidal complexes with active molecules.

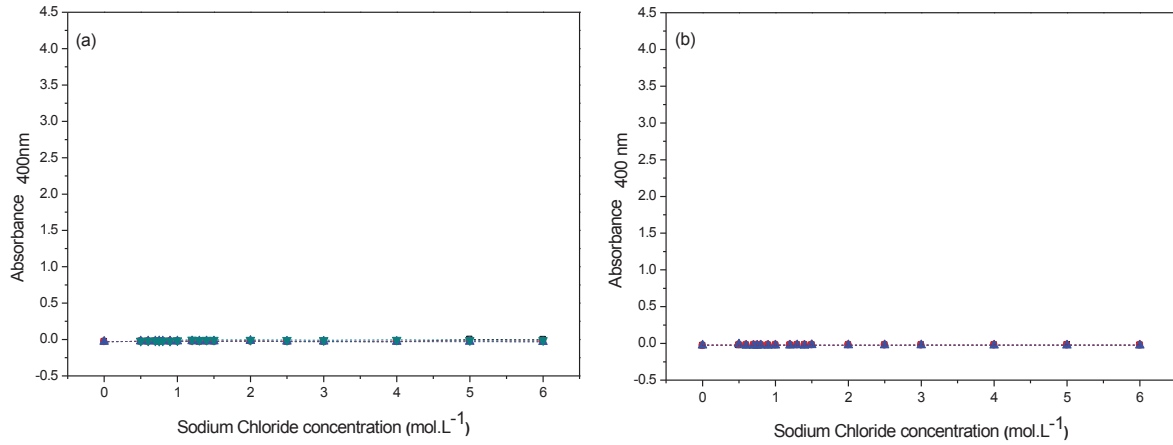
## SUPPLEMENTARY DATA

## 1. Absorbance with increasing salt concentration and varying CS molar masses



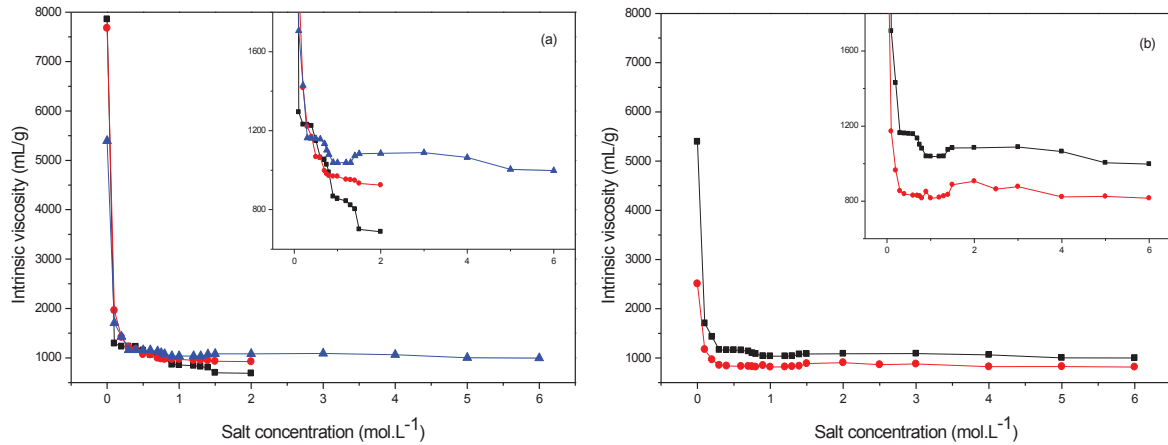
**Figure 1-SD.** Absorbances ( $\lambda = 400$  nm) of chitosan solutions as a function of NaCl concentration for a fixed polymer concentration (CS 0.5%), with varied degrees of acetylation and average molar masses: (a) DA = 9%, Mw = ■ 446 300 g.mol<sup>-1</sup>, ● 273 100 g.mol<sup>-1</sup>, ▲ 225 400 g.mol<sup>-1</sup>, ▼ 76 210 g.mol<sup>-1</sup>, ◀ 24 540 g.mol<sup>-1</sup>. (b) DA = 19%, Mw = ■ 432 800 g.mol<sup>-1</sup>, ● 308 800 g.mol<sup>-1</sup>, ▲ 287 500 g.mol<sup>-1</sup>, ▼ 107 500 g.mol<sup>-1</sup>, ◀ 33 290 g.mol<sup>-1</sup>. (c) DA = 27%, Mw = ■ 496 900 g.mol<sup>-1</sup>, ● 314 600 g.mol<sup>-1</sup>, ▲ 104 600 g.mol<sup>-1</sup>, ▼ 32 900 g.mol<sup>-1</sup>. (d) DA = 39%, Mw = ■ 458 800 g.mol<sup>-1</sup>, ● 351 500 g.mol<sup>-1</sup>, ▲ 300 400 g.mol<sup>-1</sup>, ▼ 133 300 g.mol<sup>-1</sup>, ◀ 52 050 g.mol<sup>-1</sup>. (e) DA = 47%, Mw = ■ 396 800 g.mol<sup>-1</sup>, ● 188 800 g.mol<sup>-1</sup>, ▲ 155 500 g.mol<sup>-1</sup>, ▼ 52 860 g.mol<sup>-1</sup>. (f) DA = 50%, Mw = ■ 462 600 g.mol<sup>-1</sup>, ● 304 500 g.mol<sup>-1</sup>, ▲ 273 800 g.mol<sup>-1</sup>, ▼ 178 400 g.mol<sup>-1</sup>.

## 2. Solubility of dextran sulfate on salt solution



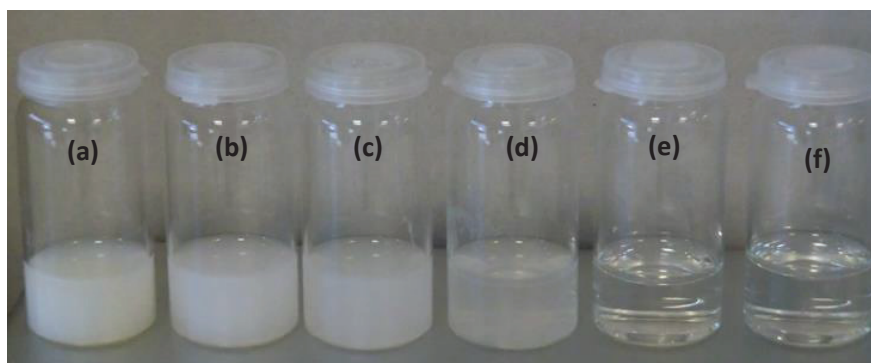
**Figure 2-SD.** Absorbance measurements ( $\lambda = 400$  nm) of dextran sulfate solutions as a function of salt concentrations (a) *Variation of dextran sulfate concentration* (■ DS 0.25%, ● DS 0.5%, ▲ DS 1.5%, ▼ DS 3%). (b) *Variation of dextran sulfate average molar mass* (■  $M_w = 12.86 \times 10^5 \pm 0.1$  g.mol<sup>-1</sup>, ●  $M_w = 0.15 \times 10^5 \pm 0.02$  g.mol<sup>-1</sup>, ▲  $M_w = 0.08 \times 10^5 \pm 0.02$  g.mol<sup>-1</sup>).

## 3. Effect of salt on chitosan viscosity



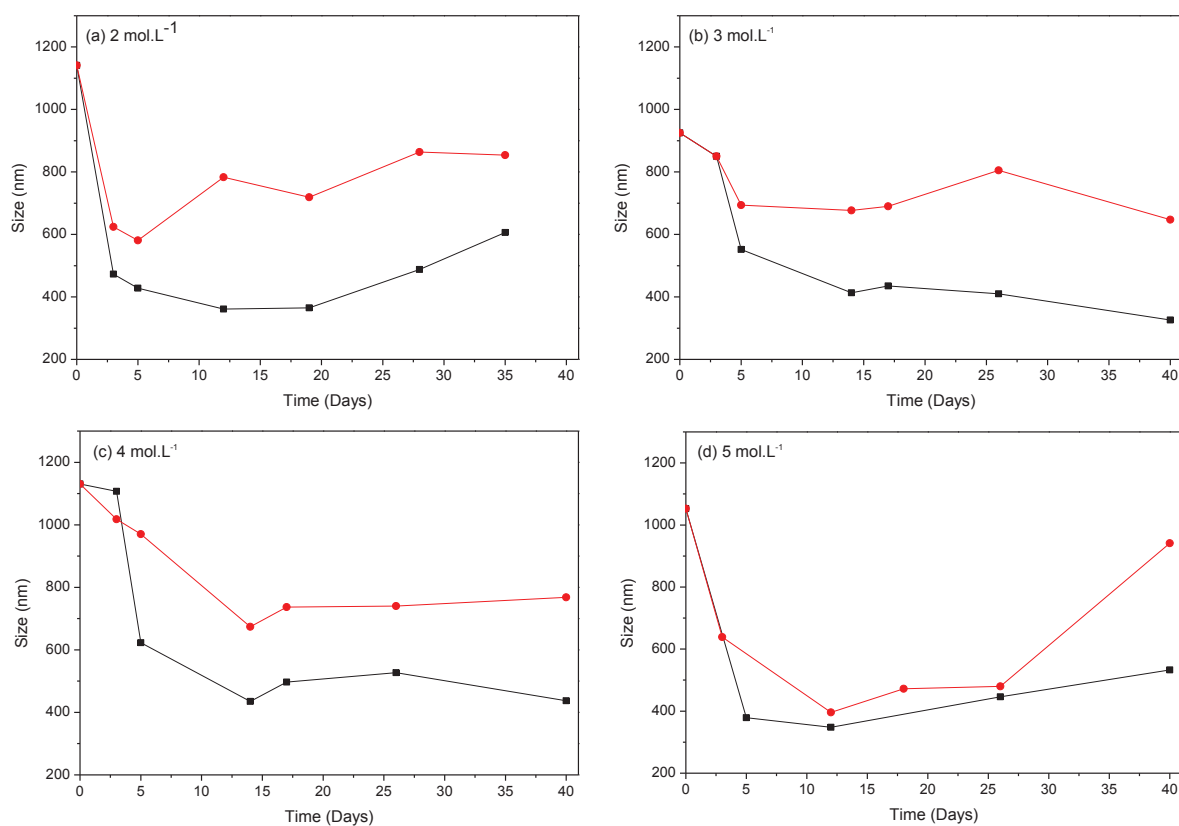
**Figure 3-SD.** Plots of the intrinsic viscosity of chitosan and NaCl mixtures as a function of the salt concentrations. (a) *Chitosan  $M_w$  around 400 000 g.mol<sup>-1</sup> and varied degrees of acetylation*: ■ DA = 27%, ● DA = 32% ▲ DA = 50%. (b) *Chitosan samples with fixed degree of acetylation (50%) and varied  $M_w$* : ■  $M_w = 486\,600$  g.mol<sup>-1</sup>, ●  $M_w = 133\,600$  g.mol<sup>-1</sup>.

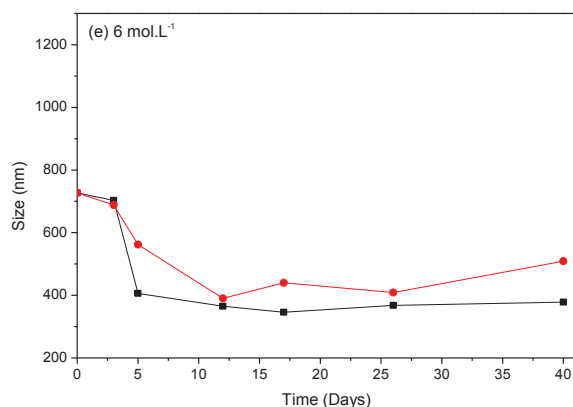
#### 4. Reversibility of the controlled polyelectrolyte complexation process



**Figure 4-SD.** Effect of the sodium chloride concentration on the reversibility of the controlled polyelectrolyte complexation method. *Particles dispersion (1.5% (v/v)) obtained by controlled polyelectrolyte complexation with salt added at: (a) 0 mol.L<sup>-1</sup>. (b) 0.5 mol.L<sup>-1</sup>. (c) 1 mol.L<sup>-1</sup>. (d) 1.5 mol.L<sup>-1</sup>. (e) 2 mol.L<sup>-1</sup>. (f) 6 mol.L<sup>-1</sup>.*

#### 5. Colloidal stability in water





**Figure 5-SD.** Colloidal stability over time for dispersions stored in water (solid content= 1.5%) ■ 37°C; ● RT.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to acknowledge Pierre Alcouffe and the Centre Technologique des Microstructures - Université Claude Bernard Lyon 1 (<http://microscopies.univ-lyon1.fr/>) for their expertise and assistance in electron microscopy. We also are in debt to Jean-Michel Lucas and Agnès Crépet for their expertise and assistance in molar mass determination by SEC. This work was financed by the ANR project PECSDDeli. MC is grateful to the ANR project PECSDDeli for attributing her PhD grant. We also thank all the BM2-D2AM staff for the help and various expertises during the SAXS/WAXS experiments at ESRF.

## ABBREVIATIONS

Cc, critical salt concentration; SSC, screening salt concentration; CDS, complex dissociating salt; PSC, particles solid content.

## REFERENCES

1. Kabanov, A. V., Bronich, T. K., Kabanov, V. A., Yu, K. & Eisenberg, A. Soluble Stoichiometric Complexes from Poly ( N -ethyl-4-vinylpyridinium ) Cations and Poly ( ethylene oxide ) - block -polymethacrylate Anions. *Macromolecules* **29**, 6797–6802 (1996).
2. Kabanov, V. A. & Zezin, A. B. A new class of complex water-soluble polyelectrolytes. *Macromol. Chem. Phys.* **6**, 259–276 (1984).
3. Spruijt, E., Cohen Stuart, M. a. & van der Gucht, J. Linear Viscoelasticity of Polyelectrolyte Complex Coacervates. *Macromolecules* **46**, 1633–1641 (2013).
4. Chollakup, R., Smitthipong, W., Eisenbach, C. D. & Tirrell, M. Phase Behavior and Coacervation of Aqueous Poly(acrylic acid)–Poly(allylamine) Solutions. *Macromolecules* **43**, 2518–2528 (2010).
5. Gucht, J., Spruijt, E., Lemmers, M. & Cohen Stuart, M. A. Polyelectrolyte complexes: bulk phases and colloidal systems. *J. Colloid Interface Sci.* **361**, 407–22 (2011).
6. Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C. & Delair, T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* **5**, 1882–92 (2004).
7. César, M.-B. *et al.* Structure and mechanism formation of polyelectrolyte complex obtained from PSS/PAH system: effect of molar mixing ratio, base–acid conditions, and ionic strength. *Colloid Polym. Sci.* **291**, 683–690 (2012).
8. Hales, K. & Pochan, D. J. Using polyelectrolyte block copolymers to tune nanostructure assembly. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 330–336 (2006).
9. Dautzenberg, H. Polyelectrolyte Complex Formation in Highly Aggregating Systems. 1. Effect of Salt: Polyelectrolyte Complex Formation in the Presence of NaCl. **9297**, 7810–7815 (1997).
10. Mihai, M., Dragan, E. S., Schwarz, S. & Janke, A. Dependency of particle sizes and colloidal stability of polyelectrolyte complex dispersions on polyanion structure and

- preparation mode investigated by dynamic light scattering and atomic force microscopy. *J. Phys. Chem. B* **111**, 8668–75 (2007).
11. Lankalapalli, S. & Kolapalli, V. R. M. Polyelectrolyte complexes : a review of their applicability in drug delivery technology. *Indian J Pharm Sci.* **71**, 481–487 (2009).
  12. Hartig, S. M. *et al.* Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharm. Res.* **24**, 2353–69 (2007).
  13. Muzzarelli, R. a. a., Greco, F., Busilacchi, A., Sollazzo, V. & Gigante, A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydr. Polym.* **89**, 723–739 (2012).
  14. Hamman, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar. Drugs* **8**, 1305–22 (2010).
  15. Douglas, K. . & Tabrizian, M. Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn* **16**, 43–56 (2005).
  16. Ichikawa, S., Iwamoto, S. & Watanabe, J. Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1637–42 (2005).
  17. Du, J. *et al.* Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. I. Physicochemical characterization of the carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles. *Biopolymers* **78**, 1–8 (2005).
  18. Boddohi, S., Moore, N., Johnson, P. a & Kipper, M. J. Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan. *Biomacromolecules* **10**, 1402–9 (2009).
  19. Delair, T. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78**, 10–8 (2011).

20. Schatz, C. *et al.* Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir* **20**, 7766–78 (2004).
21. Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A. & Delair, T. Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides : Formation and Stoichiometry Monitoring. *Langmuir* 10950–10958 (2007).
22. Weber, C. *et al.* Polysaccharide-based vaccine delivery systems: Macromolecular assembly, interactions with antigen presenting cells, and in vivo immunomonitoring. *J. Biomed. Mater. Res. A* **93**, 1322–34 (2010).
23. Vachoud, L., Zydowicz, N. & Domard, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydr. Res.* **302**, 169–177 (1997).
24. Ueno, K. & Kina, K. Colloid titration-A rapid method for the determination of charged colloid. *J. Chem. Educ* **62**, 627 (1985).
25. Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C. & Domard, A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* **4**, 641–8 (2003).
26. Boucard, N. *et al.* Polyelectrolyte microstructure in chitosan aqueous and alcohol solutions. *Biomacromolecules* **8**, 1209–1217 (2007).
27. David, L. *et al.* Ordering in Bio-Polyelectrolyte Chitosan Solutions. *Macromol. Symp.* **222**, 281–286 (2005).
28. Popa-Nita, S., Alcouffe, P., Rochas, C., David, L. & Domard, A. Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms. *Biomacromolecules* **11**, 6–12 (2010).
29. Fresnais, J., Lavelle, C. & Berret, J.-F. Nanoparticle Aggregation Controlled by Desalting Kinetics. *J. Phys. Chem. C* **113**, 16371–16379 (2009).
30. Yan, M., Fresnais, J. & Berret, J.-F. Growth mechanism of nanostructured superparamagnetic rods obtained by electrostatic co-assembly. *Soft Matter* **6**, 1997 (2010).



### 3. Bilan

Dans cette première publication nous avons montré l'intérêt de la méthode de complexation contrôlée à former des colloïdes à partir de polysaccharides de concentration quinze à trente fois supérieure à celle décrite par la littérature. Cette méthode est simple à mettre en œuvre et se déroule entièrement dans l'eau. Elle est basée sur l'écrantage des interactions électrostatiques entre deux polysaccharides de charges opposées suite à l'ajout d'une concentration de  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  en chlorure de sodium.

La solubilité des polyélectrolytes en présence de NaCl conditionne la faisabilité du procédé. Nous avons montré qu'à partir d'une certaine concentration critique en NaCl, le chitosane se déssolubilise ce qui induit la précipitation de la solution. La valeur de cette concentration critique en sel est directement affectée par le degré d'acétylation du chitosane : au-delà d'un *DA* statistique limite de 39%, le chitosane reste soluble quelle que soit la force ionique du milieu. Nous avons interprété cet effet en considérant qu'avec l'augmentation du DA, qui induit une diminution de la densité de charges du polymère, le chitosane perd son caractère polyélectrolyte mais, en même temps, accroît sa polarité grâce à l'augmentation de la fraction de fonctions N-acétyl, favorisant ainsi la formation de liaisons hydrogènes avec l'eau et donc la solubilité du chitosane.

Le sulfate de dextrane est soluble à toute force ionique. Ceci peut être attribué à la très grande flexibilité de la liaison glycosidique  $\alpha 1 \rightarrow 6$ .

Le mélange des solutions de polyélectrolytes contenant  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de sel ou plus, conduit à l'obtention d'une solution limpide, faisant suite à l'écrantage total des charges des deux polymères. Au cours de l'étape de dialyse, avec la diminution de la force ionique, les interactions électrostatiques permettent progressivement l'auto-assemblage des polyélectrolytes pour donner des particules, qui, après réorganisation des chaînes macromoléculaires présentent des tailles colloïdales.

Ce procédé présente aussi l'avantage d'être réversible : l'ajout de  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  de chlorure de sodium dans les dispersions re-solubilise les particules pour former le mélange limpide d'avant

dialyse. L'élimination progressive de ce sel ajouté par dialyse conduit à la formation de particules. Ce cycle dissolution/assemblage peut être répété plusieurs fois.

Les variations de la stabilité colloïdale avec les paramètres externes comme la température, la concentration en sel sont attribuables à la réversibilité de ces associations. L'une des conclusions les plus importantes de ce travail est que le contrôle de la cinétique de formation des particules soit par l'utilisation d'une concentration élevée en sel d'écrantage soit par la diminution de la cinétique de dialyse conduit à un système thermodynamiquement contrôlé.

### **III. Application comme vecteurs de molécules biologiques**

#### **1. Publication 2: « Controlling the complexation of Polysaccharides into multi-functional colloidal assemblies for nanomedicine »**

La complexation contrôlée de polysaccharides conduit à des particules de distribution en taille et de potentiel zêta reproductibles. Prenant ces résultats comme point de départ, nous avons voulu savoir si cette méthode était applicable à d'autres polysaccharides. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser l'héparine, polysaccharide linéaire de la famille des glycosaminoglycanes. Ce polymère contient 3 fonctions sulfate par unité sucre contre 2,2 en moyenne pour le sulfate de dextrane. Cette publication vise deux objectifs. Le premier consiste à évaluer la stabilité des systèmes chitosane/sulfate de dextrane et chitosane/héparine dans divers conditions physiologiques (PBS pH 7.4, et HCl à pH 1.2 mimant l'estomac). Le deuxième point consiste à tester l'aptitude de ces systèmes colloïdaux à véhiculer des molécules d'intérêt thérapeutique en étudiant l'encapsulation d'un principe actif modèle et la fonctionnalisation interfaciale par des agents de ciblage de type IgA.

## **Controlling the complexation of polysaccharides into multi-functional colloidal assemblies for nanomedicine.**

*M. Costalat,<sup>†</sup> P. Alcouffe,<sup>†</sup> L. David,<sup>†</sup> and T. Delair<sup>†</sup>*

Ingénierie des Matériaux Polymères, Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5223 IMP, 15, Bd, A. Latarjet, Bât. Polytech, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Corresponding author information. E-mail: [Thierry.Delair@univ-lyon1.fr](mailto:Thierry.Delair@univ-lyon1.fr)

**ABSTRACT:** The controlled assembly of oppositely charged polysaccharides led to colloids stable in physiological media, capable of encapsulating a molecular drug and of sorbing proteins at their interface. Two types of particles were obtained: both chitosan-dextran sulfate (CS-DS) and chitosan-heparin (CS-HP) stable over 30 days in PBS at 25 and 37°C. At gastric pH 1.2, these particles remained stable over 3 days, enough for a stomach transit. The structural analysis by Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) showed that CS-DS surface was semi-rough and chains inside particle exhibited rod-like conformation. Moreover, the particle interfaces could efficiently be functionalized with anti-OVA or anti- $\alpha 4\beta 7$  antibodies, in PBS, with conservation of the antibody bioactivity over at least 8 days. Finally, during the assembly process, a molecular model drug, AMP, could be encapsulated with a loading efficiency up to 72% for CS-DS particles and 66% for CS-HP. All these data establish that the controlled assembly process under equilibrium conditions lead to colloids well suited for the targeted nanodelivery of drugs.

**KEYWORDS :** Chitosan, Dextran sulfate, heparin, Colloids, polyelectrolyte complexes, functionalization, antibodies, encapsulation.

**ABBREVIATIONS:** SSC, screening salt concentration; PSC, particles solid content.

## 1. Introduction

Nanoparticles have been under intense development as tools for nanomedicine<sup>1,2</sup> and they now cover a wide range of potential applications from cancer therapy<sup>3</sup> and imaging<sup>4</sup>, to vaccine adjuvantation<sup>5,6</sup>. These tools tend to be more and more powerful as they can be multi-functional or response to external stimuli<sup>7</sup>. In the context of nanomedicine, the carriers should be safe for the patients, which require the use of non-toxic materials and also the implementation of manufacturing processes that do not involve any potentially toxic chemicals. Taking these specifications into account, colloids obtained from the complexation of oppositely charged polysaccharides are quite promising because they can be obtained from naturally occurring polymers via an all-in water process, excluding the use of chemical cross-linkers and organic solvents<sup>8</sup>. Chitosan, a  $\beta(1\rightarrow4)$ -linked copolymer of glucosamine and N-acetyl glucosamine, obtained from partial deacetylation of chitin, has been widely used in pharmaceutical applications<sup>1,9,10</sup>. Many authors have used this polysaccharide as nanodelivery system<sup>11</sup> obtained by ionic gelation<sup>12</sup> or via the formation of polyelectrolyte complexes with various polyanions<sup>13</sup>. Over the years, our group intensively investigated the formation of colloidal carriers from the complexation between dextran sulfate as polyanion and chitosan as polycation i) from the methodological and mechanism standpoint and ii) for the delivery of antigens in a vaccine adjuvantation prospect<sup>14</sup>. The particle formation procedure, very simple to implement, consisted in mixing two aqueous solutions each containing one of the polymers. Instantaneously, a colloidal complex formed visually characterized by a milky homogeneous dispersion<sup>15,16</sup>. This procedure has been widely used to obtain polysaccharide-based nanocomplexes with a great variety of counterparts<sup>8</sup> but, to remain in the colloidal domain, a high dilution, around 0.1% w/v in polymers, was used to limit the chain interpenetration, leading to macroscopic objects<sup>15,16</sup>. To increase the polymer concentration in the media, and remain in the colloidal domain, one possibility was to move from a kinetically controlled process, to one in which the macromolecular assembly would be close to equilibrium. In a recent work<sup>17</sup>, we established the feasibility of such a strategy by adding to the polyelectrolyte solutions a critical amount of sodium chloride to screen the attractive electrostatic interactions and prevent assembly on mixing. Then, the salt was dialysed from the polysaccharide mixture allowing a slow assembly of the oppositely charged polymers. Indeed, this approach allowed us to increase up to 30-folds

the polymer concentration in the mixture. Moreover, the obtained particles featured a long term colloidal stability over 40 days on storing at 37°C in water.

Our objective in the present work is double. First to demonstrate that this strategy can be extended to another naturally occurring polyanion such as Heparin and second to prove that this methodology is compatible with the development of highly performing drug delivery systems by investigating the colloidal stability in physiological media, the encapsulation of a model drug and the surface sorption of various proteins for targeting. Our long-term goal is to develop a safe and efficient antiretroviral drug nanodelivery system targeting the natural reservoirs of HIV. AIDS is now considered as a mucosal disease, with most of the critical events (eg, transmission, viral amplification, CD4+ T-cell destruction) occurring in the gastrointestinal tract, thus leading to the establishment of reservoirs<sup>18</sup>. Among them, a subpopulation of lymphoid T cells bear the  $\alpha 4\beta 7$  integrin receptor at their surface<sup>19</sup> which constitute a target for clearing the virus from infected individuals<sup>20</sup>.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The initial chitosan produced from chitin squid pens, with indexes 113, with Mw 532 000 g.mol<sup>-1</sup> and degree of acetylation of 1.5% was purchased from Mahtani chitosan Pvt. Ltd. Before all experiment, the sample was purified by a successively filtration through Millipore membranes of porosity: 3, 1.2, 0.8 and 0.45  $\mu$ m. Purified chitosan was then N-acetylated with acetic anhydride in a hydroalcoholic mixture according to the procedure described by Vachoud et al<sup>21</sup>. After N-acetylation duration reaction, the polymer was precipitated, rinsed with de-ionized water and then freeze dried.

Hydrolysis by controlled nitrous deamination was performed to produce low molar weight polymers<sup>16</sup>. Chitosan was dissolved at 0.5% (w/v) in a 0.2M acetic acid/0.15 M sodium acetate buffer. A 1 g.L<sup>-1</sup> sodium nitrite was added to chitosan solution to obtain a nitrite/glucosamine units molar ratio of 0.1. The reaction was performed under high mechanical stirring for 1 h to

obtain  $M_w$  close to  $150\,000\text{ g.mol}^{-1}$ . Likewise, in the end of the hydrolysis reaction, chitosan was recovered by precipitation with ammonia until pH 9-10, followed by repeated washings with deionized water until neutrality and finally lyophilized.

Dextran sulfate and heparin sodium salt porcine intestinal mucosa were purchased from Sigma Aldrich and were used without further purification. The average molar masses of these polyanions were determined by gel permeation chromatography, according to our previous work<sup>16</sup>. The weight average molar mass of dextran sulfate used was  $1.28 \times 10^6\text{ g.mol}^{-1} \pm 5000$  with a polydispersity index  $I_p$  of  $1.9 \pm 0.1$ . Heparin weight average molar mass was  $1.8 \times 10^4\text{ g.mol}^{-1} \pm 5000$  with a polydispersity index  $I_p$  of  $1.0 \pm 0.1$ . The water content was determined by thermogravimetric analysis (TA Instrument TGA Q500). The degree of sulfation, corresponding to the number of sulfate moieties per glucosidic unit was determined by colloidal titration using toluidine blue<sup>16</sup>. The degree of sulfation was 2.1 for dextran sulfate and 3.18 for heparin.

The monoclonal Immunoglobulin A (IgA), a chimeric anti-Ovalbumin (anti-OVA) clone A1 and a chimeric anti- $\alpha 4\beta 7$  Integrin clone 7G3 were provided by B Cell Design (Limoges, France). Before using, their concentrations were confirmed by BCA Assay according to the procedure provided by Pierce, Thermo Fischer Scientific. Phosphate buffered solution (PBS) was from Invitrogen and the drug model adenosine 5'-monophosphate monohydrate (AMP) with 97% of purity was from Sigma Aldrich.

## **2.2. Methods.**

### **2.2.1. Characterization of chitosan**

Degree of acetylation was determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (Brucker Avance III 400 MHz) at  $25^\circ\text{C}$  according to the method developed by Hiraï et al<sup>22</sup>. The water content was determined by thermogravimetric analysis (TA Instrument TGA Q500). The weight average molar mass  $M_w$  and the polydispersity indexes ( $I_p$ ) were measured by size exclusion chromatography (2500 and 6000 PW TSK gel columns from Tosohaas) coupled on-line with a differential refractometer (Wyatt Optilab T-rEx) and a multiangle laser light scattering detector (Wyatt Dawn EOS)

operating at  $\lambda = 633$  nm. A degassed 0.2 M acetic acid/0.15M ammonium acetate buffer with a pH 4.5 was used as the eluent. The flow rate was maintained at 0.5 mL/min. The refractive index increments ( $dn/dc$ ) for each degree of acetylation of chitosan was determined according to a previous work<sup>23</sup>. The chitosan used in this study had a DA of 49% and an Mw of 133, 000 g.mol<sup>-1</sup>.

### **2.2.2. Preparation of chitosan based nanoparticles by controlled polyelectrolytes association**

Chitosan was dispersed at 1.5% (w/v), 3% (w/v) and 4% (w/v) in deionized water taking into account the residual water. The dissolution was achieved under mechanical stirring by adding a stoichiometric amount of acetic acid with respect to the free amine groups corresponding to the degree of acetylation used. The pH was adjusted to 4.0 with 0.1M acetic acid. Then, sodium chloride was added to reach 2 mol.L<sup>-1</sup> or higher (3; 4; 5 and 6 mol.L<sup>-1</sup>) to assess the impact of the ionic strength of the starting solution on the structural aspect of the colloids (see 2.2.6.5). Dextran sulfate solutions at 1.5% (w/v) and 3% (w/v) and heparin solutions at 1.5% (w/v), 3% (w/v) and 4% (w/v) were prepared directly in deionized water, the pH was adjusted and the concentration of salt was 2 mol.L<sup>-1</sup>.

The polyelectrolyte complex formation by controlled association was performed at room temperature. Dextran sulfate or heparin solutions were mixed with the chitosan solution at a molar charge ratio  $R (n+/n-) = 2$ , under a constant magnetic stirring of 800 rpm. This solution was then poured into a dialysis bag (Spectra/Por®) with a molecular weight cut-off (MWCO) of 3,500 to progressively remove the salt and, consequently, induce the complexation of the two natural polyelectrolytes. Dialysis was carried out against deionized water and the bath was changed every hour during the three first hours. It was then changed every two hours until the end of the dialysis process (8 h).

### 2.2.3. Nanoparticle colloidal stability investigation

After formation, the CS-DS and CS-HP particles were let to stabilize 10 days at 37°C. They were centrifuged 1h at 23 000 g and re-dispersed at different solid contents in PBS, hydrochloride acid at pH 1.2. The particle stability monitoring was achieved by measuring the sizes and zeta potentials at various time intervals of samples stored at RT or 37°C.

### 2.2.4. Entrapment of adenosine 5'-monophosphate monohydrate (AMP) into Nanoparticles

To prepare AMP loaded CH-DS or CS-HP nanoparticles, 40 mg of AMP was dissolved in 6 mL of 1M NaOH. One volume was then diluted into 1M acetic acid, to obtain an AMP concentration of *ca* 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Then, the pH of this solution was adjusted to 7-8 using a few microliters of pure acetic acid, to prevent the precipitation of chitosan in the following step. A volume of AMP solution corresponding to 10%, 20%, 30% and 50% mass ratios ( $m_{AMP} \text{ (mg)} / m_{Chitosan} \text{ (mg)}$ ) was then added to polyanions and salt solution required for complexation. This mixture was then added in one shot into the chitosan/salt solution maintained under a constant magnetic stirring of 800 rpm. This solution was put to dialysis using a Spectra/Por® membrane with MWCO of 100, to prevent the loss of drug into water bath. To avoid the loss of drug in the dialysis solution, the water bath remained unchanged throughout the dialysis step (5h).

### 2.2.5. Loading and entrapment efficiency of AMP

The content of encapsulated AMP was determined either: (i) directly by redissolution of the particles, as described below using unloaded particles as blank or (ii) via the difference between the total amounts of AMP used to prepare the carriers and the amount of free AMP remaining in the supernatant after the particle elaboration step. In both cases, the AMP concentration was determined measuring the absorbance at 260 nm, using a calibration curve established in the same buffer. The lowest detectable concentration of AMP was 2.5 µg/mL.



Briefly, the particle dispersions were centrifuged 1 h at 23 000 g. The supernatants were separated from the pellet and the AMP content was measured after an extra centrifugation step to remove all potentially remaining particles. To the pellet, the same volume of 2 mol.L<sup>-1</sup> NaCl aqueous solution was added. After 1 h of stirring at room temperature, a clear solution was obtained and the AMP concentration was determined as above described.

### **2.2.6. Characterization of particle dispersion**

#### *2.2.6.1. Particle solid contents*

Dispersions were centrifuged at 23 000 g for 1 h to separate particles from the aqueous phase. The supernatant was carefully discarded, and the pellet was dried overnight at 60°C. The solid content was determined by the ratio between the weights of dried particles to the initial weight of the dispersion.

#### *2.2.6.2. Quasi-elastic light scattering*

Particles size was measured by dynamic light scattering at  $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  performed on a Malvern Zetasizer ZS equipped with a 10 mW He/Ne laser beam operated at  $\lambda = 633 \text{ nm}$  and at  $173^\circ$  scattering angle. The self-correlation function was expanded in a power series (Cumulants method). The measured polydispersity value (PDI) is a dimensionless parameter defined as the ratio  $\mu_2 / \Gamma^2$ , where  $\mu_2$  is the second cumulant of the correlation function and  $\Gamma$  is the average decay rate. For measurement, particles were diluted in the medium used as dispersant. The data were the average of five runs of ten experiments each for one same sample.

#### *2.2.6.3. Electrophoretic mobilities*

The Zeta potential of particles were determined by measuring the electrophoretic mobilities ( $5 \times 10$  measurements) by laser Doppler anemometry at  $25^\circ\text{C}$  using a Malvern Zetasizer NanoZS

from Malvern Instruments. The conversion to zeta potentials used Smoluchowski's equation. Before measurement, particles were dispersed in the solvent used to study their stabilities.

#### *2.2.6.4. Scanning electron microscopy*

The morphology and the shape of chitosan-dextran sulfate and chitosan-heparin particles were examined using scanning electron microscopy (FEI Quanta 250 FEG). A droplet of 0.01% (v/v) particles dispersion was deposited on an aluminum sample holder, air dried at room temperature, or not, before observation after an Au/Pd metallization. The voltage used was in the 5-20 kV range.

#### *2.2.6.5. Small angle X-ray scattering*

Small angle X-ray scattering (SAXS) experiment was performed at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) on the line BM2-D2AM. Particle dispersions at 1.5% and 3% of solid content formed from different screening salt concentration (2, 3, 4, 5 and 6 mol.L<sup>-1</sup>) were put in silica cylindrical tubes (internal diameter of 3 mm, wall thickness 0.2 mm, 7.6 cm long, from Deutero GmbH, ref. 2000942) with elastomer closure caps to avoid water evaporation (Deutero ref. 2960415). The incident photon energy was set to 16.000 keV to limit attenuation by the glass tubes.

A 2D CCD X-ray detector from Ropper scientific was used. The images were corrected for camera distortion, dark image reading and flat field response of the detector. Radial averages were processed with BM2IMG software available on the beamline.

#### **2.2.7. Protein sorption onto colloidal PECs**

Particle dispersions at various solid contents and antibody solutions at different concentrations were prepared in PBS. One volume of particle dispersion was mixed with one volume of

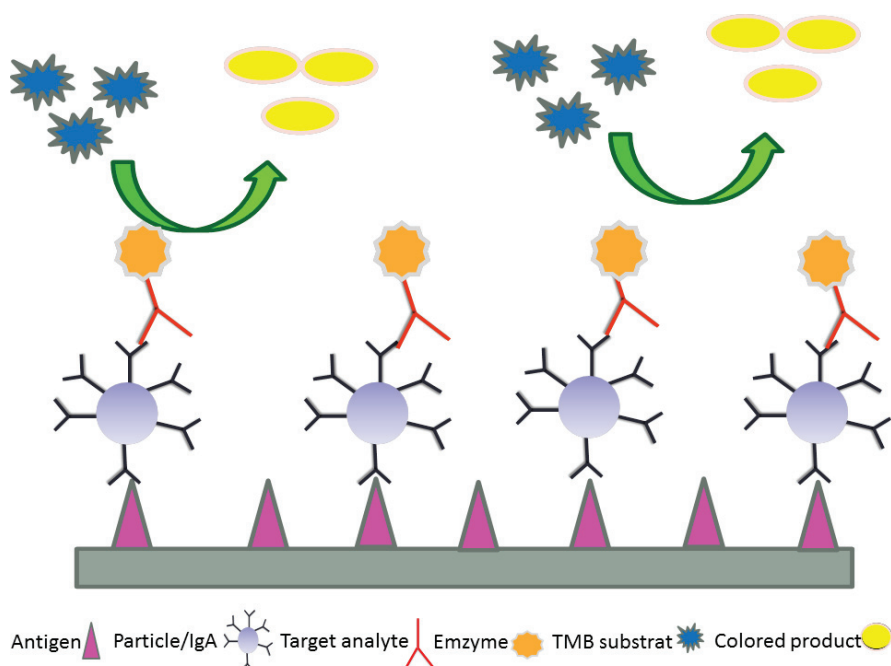
antibody solution (IgA) under end-overhead stirring. At different times, IgA/particles were centrifuged 10 min at 23 000 g to remove the residual particles. The supernatant containing the free IgA was separated and was used for the BCA assay titration carried out according to the manufacturer's instructions. The amount of free IgA was deduced from a calibration obtained by serial dilutions of a parent IgA solution in PBS. The sorption yields were calculated from following equation:

$$\text{Sorption yield (\%)} = \frac{[IgA]_{input} - [IgA]_{residual}}{[IgA]_{input}} \times 100$$

Where  $[IgA]_{input}$  represents the IgA concentration titrated in the control sample defined as reactants without particles suspension.  $[IgA]_{residual}$  is obtained from titration of the supernatant, taking into account the background signal from a blank experiment representing particle dispersion without antibody.

#### 2.2.8. ELISA assays

The bioactivity of IgA/particles was monitored over 8 days by ELISA, as summarized in Figure 1. A microplate was coated 2 h at 37°C with 100 µL of a 1 µg/mL ovalbumin or recombinant human integrin antigen solution in PBS. The plates were post-coated for 1 h at 37°C with 200 µL of 10% non-fat dry milk PBS and washed three times with 0.05% Tween20-PBS. Serial dilutions of IgA/CH-DS or IgA/CH-HP particles were prepared in 1% bovine serum albumin (BSA)-PBS; 100 µL were added to the plates in duplicates and incubated for 1 hr at 37°C. Three washes with PBST buffer were the occurred. Peroxidase-conjugated IgA anti-human IgA-HRP (Invivogen) at a concentration of 0.2 µg/mL in 1% BSA-PBS was added and the plate was incubated for 1h at 37°C. The plates were washed, and were developed with tetramethylbenzidine (TMB) prepared according to the manufacturer's instructions. This all was incubated 10 min in the dark and the reaction was quenched with 100 µL of 1N sulfuric acid. The absorbance at 450 nm was measured with a Model 680 Microplate Reader. Control experiments were carried out for each test including, a nonrelevant antibody, a nonrelevant conjugate, blank particles and a nonrelevant antigen coated on the micro-titer plates.



**Figure 1.** ELISA assay (tetramethylbenzidine (TMB), enzyme substrate).

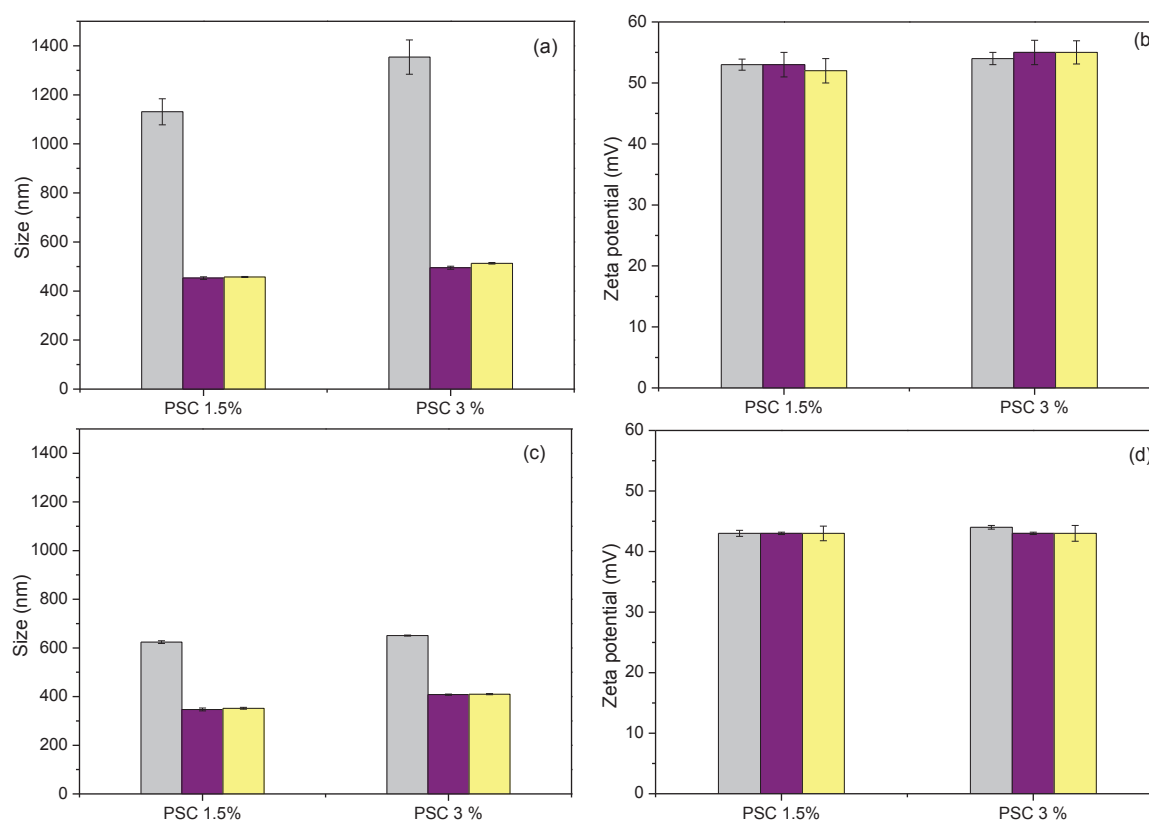
### 3. Results and discussion

The goal of this investigation was to establish that controlled polyelectrolyte assembly, a new mode of elaboration of colloidal polyelectrolyte complexes, is capable of yielding particles that meet the requirements for use as drug carrier in nanomedicine. In other words, the particles should be stable in physico-chemical conditions corresponding to physiological pH and ionic strength including the specific case of an oral delivery, capable to load an active molecule and a targeting system.

#### 3.1. The controlled complexation of polyelectrolytes into colloids

The formation of most colloidal polyelectrolyte complexes relies on the kinetically controlled complexation of oppositely charged polymers, as mentioned in the introduction. We recently reported the feasibility of an assembly process close to equilibrium, using dextran sulfate as

polyanion and chitosan as polycation<sup>17</sup>. We showed that the controlled assembly of chitosan and dextran sulfate at a charge ratio  $R (n^+/n^-) = 2$  led to particles of submicrometric size after stabilization. Moreover, the size equilibration time was shortened when the dialysis process was closer to equilibrium, by using decreasing salt concentrations in the dialysis baths<sup>17</sup>. To widen the scope of applications of this new technology to another bioactive polysaccharide, we used heparin as polyanion. ‘A behaviour similar to that with dextran sulfate (Figures 2 a and b) was observed with Heparin : particles around 300 nm, with zeta potentials ca +40mV (Figure 2c and 2d respectively) were obtained after 10 days of storing at 37°C, suggesting that the objects from dialysis could still undergo reorganization processes to thermodynamically more stable colloids<sup>17</sup>.



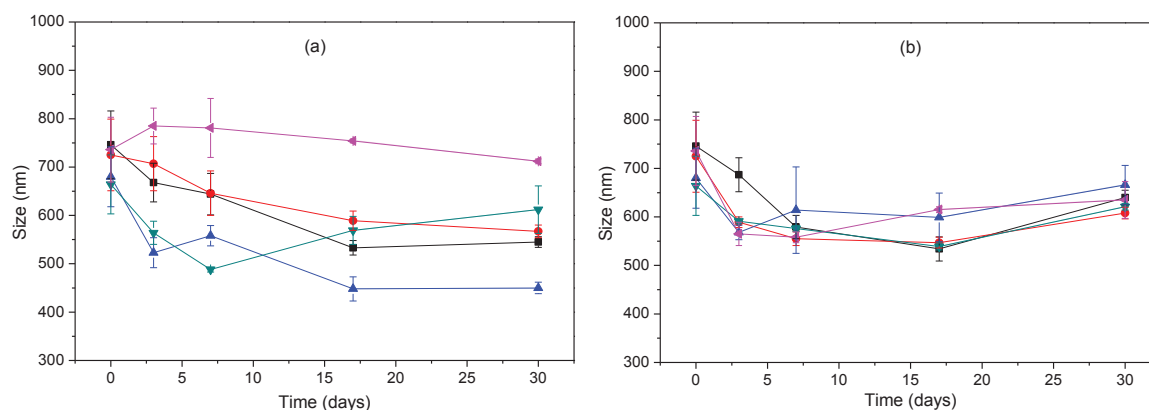
**Figure 2.** Particles formed by controlled complexation and dispersed in water at 1.5% and 3% particle solid content (PSC). CS-DS particles (a) size (b) Zeta potential and CS-HP particles (c) size and (d) zeta potential. ■ after dialysis, ■ 10 days at 37°C, ■ 40 days at 37°C. Dialysis achieved from dialysis membrane with MWCO 3,500. Error bars correspond to the standard deviation of three samples from three different experiments.

With this technology in hands, our objective is to establish that these objects can be efficient tools for nanomedicine in terms of colloidal stability in physiological media and of ability to encapsulate a model drug or to adsorb targeting species at their surfaces.

### **3.2. Colloidal stability in physiological media**

A physiological salt concentration and a neutral pH of 7.4 may alter the colloidal stability of the nanocomplexes, as the salt concentration will entail a decrease in intensity of the electrostatic attractive forces and pH will decrease the charge density on chitosan chains, potentially favoring the disruption of the complexes<sup>14</sup>.

The colloidal stability in PBS of particles obtained by kinetically controlled complexation has already been observed, but at lower solid contents<sup>24</sup>. The major break-through from the controlled assembly process concerns the long-term conservation of the colloidal stability at high solid contents of polyelectrolyte nanocomplexes on storing the dispersions in PBS over 30 days, as shown in Figure 3. The general trend was a slow decrease in size with time with a marked loss in diameter after four days, which levelled off afterwards. At room temperature, slight differences were observed between the various formulations, but at 37°C, every formulation behaved similarly. Interestingly, in comparison with the stability investigation in water reported earlier<sup>17</sup>, no aggregation was observed at room temperature in PBS. This suggests that in water, the reorganizations of polymer chains could still take place within the particles, leading to complexes with enhanced charge neutralization, hence more susceptible to particle destabilization and aggregation. At 37°C, no impact of the nature of the polyanion was observed but at room temperature, the chitosan-heparin colloids had a slightly different behaviour than the dextran sulfate ones.



**Figure 3.** CS-DS and CS-HP colloidal stability in PBS at (a) RT and (b) 37°C and at different particle solid contents (PSC). CS-DS particle: ■ PSC 3%, ● PSC 1.5%, ▲ PSC 1%, ▼ PSC 0.1%. CS-HP particle: ◀ PSC 0.1%. The error bars correspond to the standard deviation of 5 independent measurements for each sample.

To mimic the behavior of the particles in the gastric environment, hence anticipating an oral delivery route, the colloidal stability was monitored with time at pH 1.2. As reported in Figures 1 and 2 of Supplementary Data for respectively the dextran sulfate-based or the heparin-based particles, the colloidal stability was maintained irrespective of the formulation.

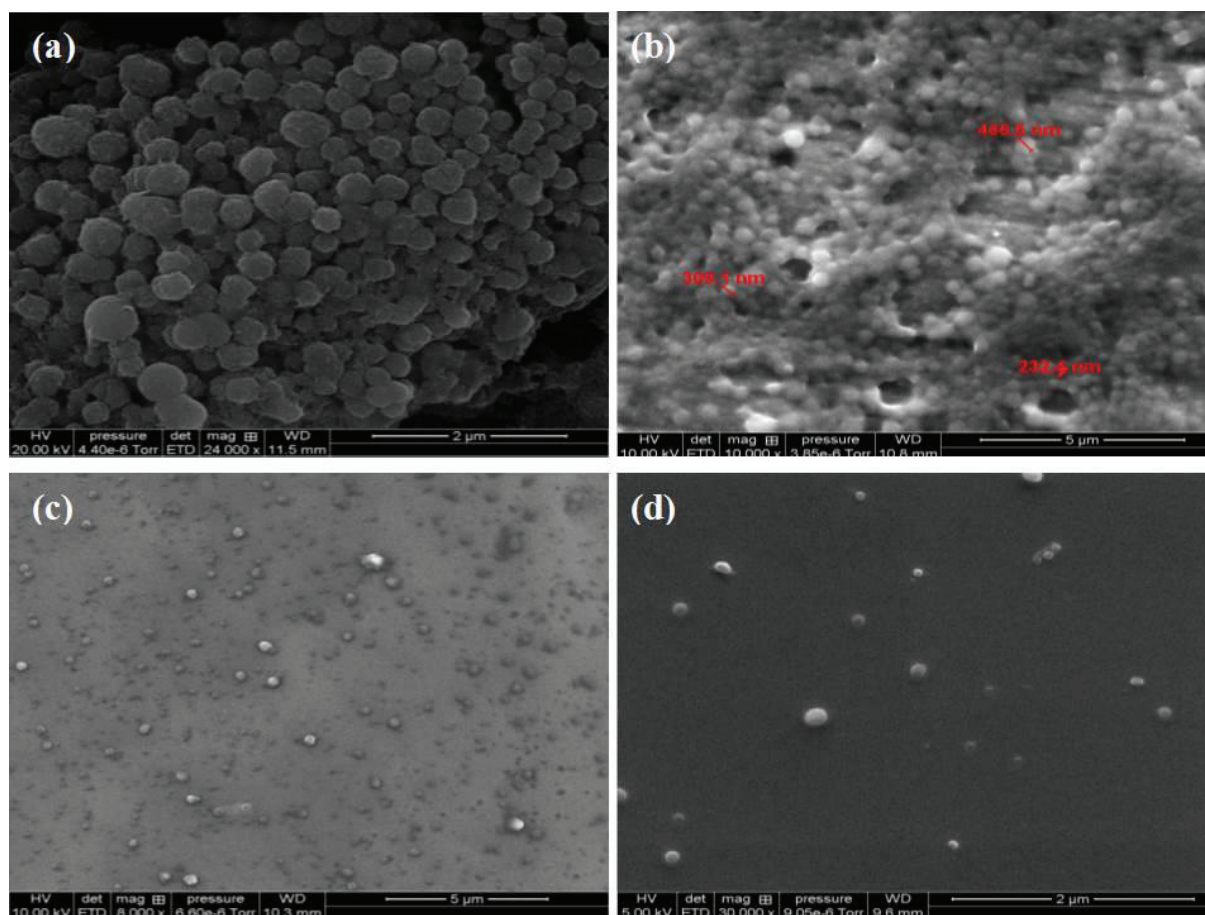
To summarize, our results clearly pointed out that the controlled complexation between chitosan and either Dextran sulfate or Heparin yielded nano-objects with a high colloidal stability in various media. In PBS at 37°C or room temperature, even at high concentrations no aggregation was noticed over 30 days. At gastric pH of 1.2, these particles remained stable over 3 days, which is much longer than stomach transit. These good stability results prompted us to go further in the characterization and investigation of these colloids for biomedical applications.

### 3.3. Microscopy

The spherical morphology of the polyelectrolyte complexes was demonstrated by Scanning Electron Microscopy. Figures 4a and b were obtained after drying the samples overnight at room



temperature and one can observe diameters ranging from 430 to 610 nm and 220 to 480 nm for the CS-DS and CS-HP complexes respectively. CS-DS particles displayed a rough interface, Figure 4a, not observed for the CS-HP nanocomplexes, but the magnification is not the same as shown by the scale bar. This rough interface could be attributed to the overnight drying step, inducing a collapse of the interface associated to the dehydration of the sample. This assumption is supported by the fact that this rough morphology was no longer observed in Figures 4 c and d for which particles were dried for only 10 min prior to metallization. In these last conditions, one can consider that the particles were observed with higher water contents than after an overnight drying. To confirm this result, experiments should be carried out by ESEM, for which the observation conditions are less harsh (pressure of 5 Torr, no drying).



**Figure 4.** Scanning electron microscopy of (a) CS-DS, (b) CS-HP after overnight drying and of (c) CS-DS, (d) CS-HP after drying the samples for 10 min.

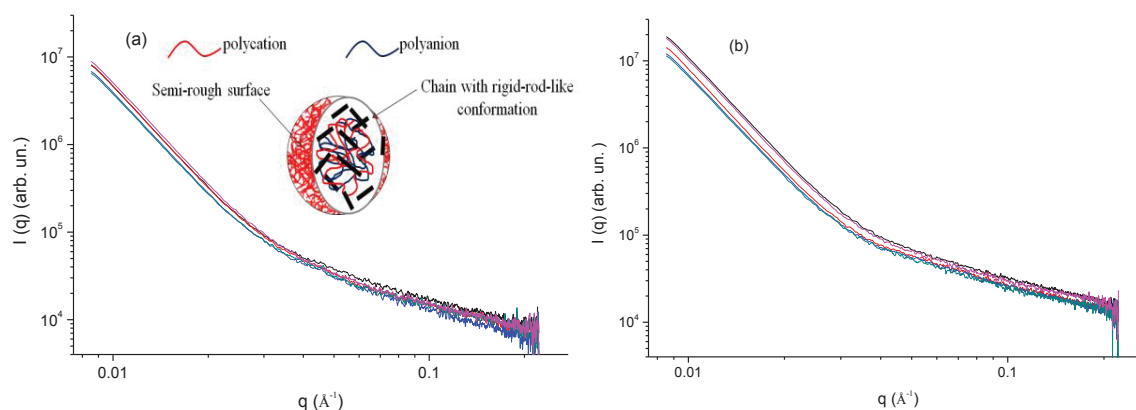


### 3.4. Intraparticular nanostructure

In order to study the intra-particle organization of the colloids, small angle X-ray scattering was performed on particles dispersed in water at 1.5 % and 3% solid content, but obtained from polyelectrolyte solutions containing different salt screening concentration. The scattering behavior CS-DS at 1.5 % and 3% solid contents is shown respectively in Figure 5a and b in log-log scales. The polyelectrolyte organization, exhibiting the so-called ‘polyelectrolyte peak’ in the scattering of chitosan or dextran sulfate solution was not present<sup>25,26</sup>. This can be the result of the complex formation process inducing charge consumption from the polyelectrolytes. Moreover, concerning the excess chitosan its  $pK_a$  being in the 6-6.5 range is lower than the pH of the solution (7), and hence is poorly ionized. The scattered patterns could be divided in two different scattering domains, both analyzed through the scaling laws, i.e.  $I(q)=C_1/q^{\alpha_1}$  at low  $q$  values at  $q<0.03\text{\AA}^{-1}$  and  $I(q)=C_2/q^{\alpha_2}$  in the high  $q$  range up to  $0.25\text{\AA}^{-1}$ . Such scattering behaviors were analyzed accounting for the multiscale microstructure of the suspensions. The size of the particles (is out of the SAXS size window (10 Å-200 Å) as evidenced by DLS and electron microscopy. Thus, in our case, SAXS can only reveal the intra-particle nanostructure i.e. the particle surface organization and/or the internal structuration into primary particles<sup>27-29</sup> like in the case of carbon-black morphology (aggregates composed by elementary primary nanoparticles). The apparent crossover scattering vector  $q^*$  corresponded to the limit between the two scattering regimes,  $C_1/(q^*)^{\alpha_1} = C_2/(q^*)^{\alpha_2}$ , i.e.  $\text{Log}_{10}(q^*) = \frac{\text{Log}_{10}(C_1 / C_2)}{\alpha_1 - \alpha_2}$ .

The generalized Porod law was featured in the low  $q$  range with exponents  $\alpha_1$  reported in table 1. The  $\alpha_1$  values were close to 3.8, i.e. lower than 4, the Porod’s behavior  $I(q)\sim q^{-4}$  ideally being representative of a sharp electron density variation between particle and solvent, i.e. a smooth particle surface. As a result, the particle surfaces presented a rough surface with apparent surface fractal exponent  $d\sim 6-\alpha$  close to 2.115 in average at 1.5% solid and close to 2.127 at 3% solid content<sup>27</sup>. There was no clear evolution of the generalized Porod’s exponent with screening salt concentration, showing that the systems were desalinated slowly to yield equilibrium structures with identical surface organization, whatever the initial salt concentration of the mother solution: the different experiments in figure 5 thus display the reproducibility of the scattering

experiments and the nanostructuration of the particles. A very different scattering regime was present in the higher  $q$  range with scattering exponents close to 1, evidencing elementary rod-like scatters that could be due to the polyelectrolyte complexes themselves formed in desalination conditions inside the nanoparticles (the averaged exponent values  $\alpha_2$  were found close to 0.98 and 0.88 at 1.5 and 3% PSC respectively). Following this interpretation, since the rod-like behavior is observed in the  $q$ -range  $q^*=0.033$  to  $q_{\max}=0.25 \text{ \AA}^{-1}$ , a lower bound for the statistical multi-chain segment in the polyelectrolyte complex could be of the order of  $L \sim 3.82/q^* \sim 120 \text{ \AA}$  (20-25 residues long)<sup>30</sup> if a Gaussian chain statistics is used. In the  $q$ -range below  $3.82/L$ , the expected scattering behavior should be due to nanostructure at the level of the gyration radius of the chains or the gels mesh size, but such transition is superimposed to the contribution of the surface of particles at  $q^*$ . Thus  $L$  could significantly be larger than the persistence length for one single polysaccharide chain which is ca 6 nm for our chitosan sample<sup>31</sup> and 9 nm for heparin<sup>32</sup>. The lateral size of the polyelectrolyte association should be comparable or lower than  $1/q_{\max} \sim 5 \text{ \AA}$ , but is more difficult to extract precisely from the presented data<sup>33</sup>. As a result, the colloids formed by desalination complexation of chitosan and DS were globular objects (the gyration of which could not be deduced here above  $1/q_{\min} \sim 120 \text{ \AA}$ ) with fractal-like rough surfaces and an intraparticle nanostructure composed of rod-like objects with sizes compatible with extended chain polyelectrolyte associations schematically shown in Figure 5. The controlled assembly process depends on the dialysis of the excess salt used in the starting solutions (see experimental procedure) hence we investigated if this was a pertinent parameter impacting the structural organization of the particles. Our data show that increasing the screening salt concentration did not affect the intraparticle structural organization. Neither did the increase in polysaccharide concentration.



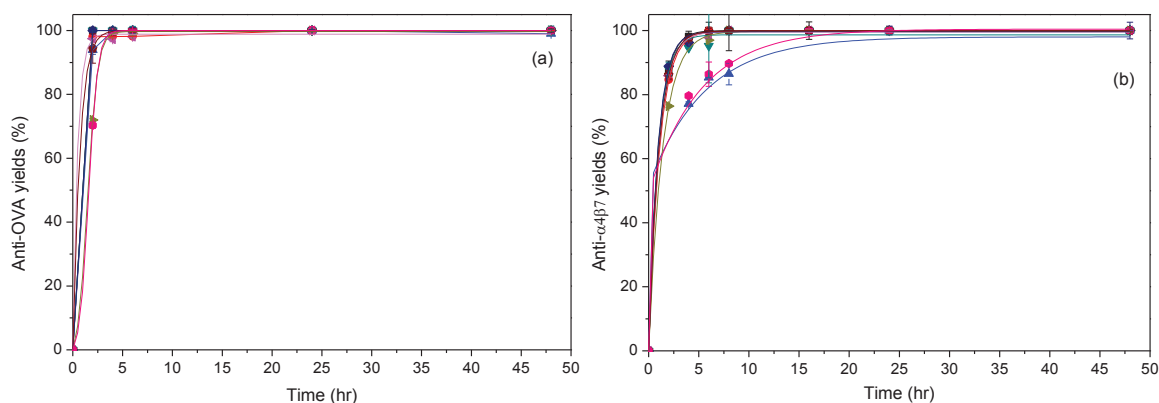
**Figure 5.** SAXS analysis of CS-DS particles formed from different salt screening concentration: (a) particle solid content (PSC) of 1.5%; (b) particle solid content (PSC) of 3%. Screening salt concentration used at: — 2M, — 3M, — 4M, — 5M, — 6M.

**Table 3.** Values of Porod exponents at low  $q$  and high  $q$  determined by small angle X-ray analysis. CS-DS particle at 1.5% and 3% formed from different screening salt concentrations: 2M, 3M, 4M, 5M and 6M.

PCS	SSC (M)	$q^*$	$1/q^*$	$C_1$	$\alpha_1$	$C_2$	$\alpha_2$
1.5%	2	0.032	31.023	0.082	3.875	1914.240	0.948
	3	0.033	29.905	0.065	3.930	1708.780	0.935
	4	0.031	32.549	0.078	3.854	886.705	1.171
	5	0.032	30.805	0.070	3.869	1856.483	0.898
	6	0.035	28.787	0.083	3.897	1797.673	0.925
3%	2	0.035	28.214	0.180	3.893	4188.500	0.883
	3	0.033	30.087	0.107	3.939	3477.469	0.888
	4	0.033	30.370	0.148	3.837	3101.766	0.921
	5	0.033	29.996	0.140	3.841	3229.226	0.886
	6	0.037	27.311	0.203	3.853	4243.092	0.844

### 3.5. IgA sorption Kinetics

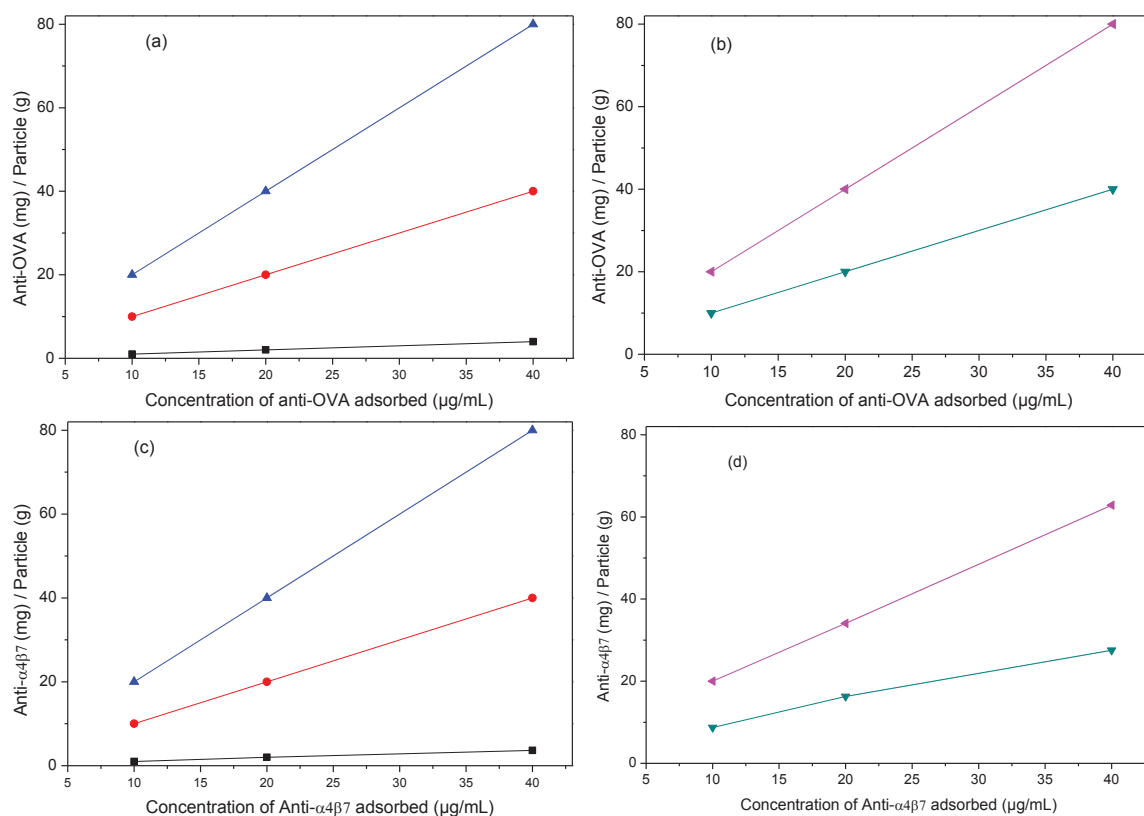
Efficient drug delivery requires the surface decoration by targeting species such as antibodies for instance. IgA immunoglobulins, secreted by the immune systems of the mucosa, are well adapted for the delivery of drugs to/through these tissues. Two different humanized IgAs were selected in this investigation, first a model one, the anti-OVA, directed against ovalbumin, which was used for preliminary experiments and the relevant one, the anti- $\alpha 4\beta 7$  IgA, corresponding to the targeted receptor of HIV-infected T-cells, as explained in the introduction. The interactions between various colloidal polyelectrolyte complexes and two IgAs, were investigated in phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS). The sorption of the anti-OVA IgA onto dextran sulfate-based particle reached completion within less than 5 hours for every condition. Similar results were obtained with the heparin-based colloids, except for the highest IgA concentrations for which the process was slightly slower (compare Figure 6 a and Figure 3-SD a). Using the anti- $\alpha 4\beta 7$  IgA had no major impact on the sorption kinetics on the chitosan dextran sulfate-based colloidal complexes, the process reached completion within 10 hours or less, Figure 6b. With the heparinated counterparts, Figure 3-SD b, the kinetics was slower than in the preceding case and, furthermore, the sorption process was limited in range and strongly impacted by the particle/IgA mass ratio.



**Figure 6.** Adsorption kinetic of adsorption of IgAs on CS-DS particles: (a) anti-OVA /CS-DS, (b) anti- $\alpha 4\beta 7$ /CS-DS. PSC 1%: ■ IgA 10  $\mu\text{g/mL}$ , ● IgA 20  $\mu\text{g/mL}$ , ▲ IgA 40  $\mu\text{g/mL}$ . PSC 0.1%: ▼ IgA 10  $\mu\text{g/mL}$ , ◆ IgA 20  $\mu\text{g/mL}$ , ► IgA 40  $\mu\text{g/mL}$ . PSC 0.05%: ◆ IgA 10  $\mu\text{g/mL}$ , ◆ IgA 20  $\mu\text{g/mL}$ , ◆ IgA 40  $\mu\text{g/mL}$ . Each data point corresponds to the average of 3 measurements  $\pm$  SD.

To have a more comprehensive understanding of the sorption process, data from Figures 6 and 3-SD were analyzed in terms of loading capacity (mg protein/g particles) at the kinetics plateaus, as a function of the protein initial input and for every particle concentration in the mixture, Figure 7. As a general trend:

- within the protein concentration range investigated, the saturation of the particles was never observed, the loading capacity did not level off;
- the particle loading capacity increased with the protein concentration;
- the particle loading capacities increased with decreasing particle contents in the medium.



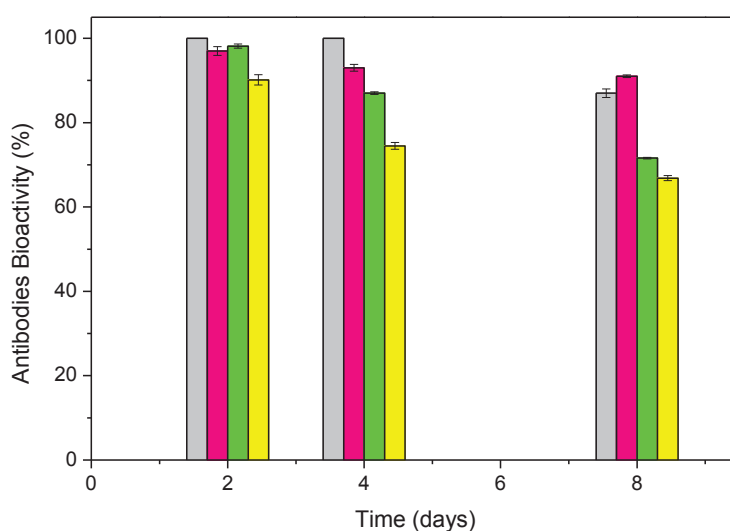
**Figure 7.** Sorbed IgA maximum amounts: (a) anti – OVA on CS-DS nanoparticles, (b) anti – OVA on CS-HP nanoparticles, (c) anti -  $\alpha 4\beta 7$  on CS-DS particles (d) anti -  $\alpha 4\beta 7$  on CS-HP particles. ■ CS-DS at PSC 1%, ● CS-DS at PSC 0.1%, ▲ CS-DS at PSC 0.05%, ▼ CS-HP at PSC 0.1% and ▲ CS-HP at PSC 0.05%.

In other words, to reach a high loading capacity, the protein to particle mass ratio should be low to observe the protein diffusion through the shell, though the driving force for this diffusion is not fully understood yet. Anyhow, the protein diffusion has also been observed in preceding studies involving colloidal PECs obtained by the kinetically controlled process<sup>24</sup>, with other proteins like an HIV-1 antigen<sup>34,35</sup>. For chitosan-based micro-particles obtained by the sodium sulfate induced gelation<sup>36</sup>, the diffusion of FITC-ovalbumin within the core of porous microparticles was evidenced by confocal microscopy. In their case, the loading capacity was not impacted by the amount of ovalbumine available, hence, the more protein was offered, the more remained unbound during the process. The authors attributed the binding to electrostatic interactions, though in PBS, most ammonium groups are deprotonated. The diffusion at low ionic strength of bovine serum albumin (BSA) through polyacrylate brushes at the surface of polystyrene particles, was attributed, by Ballauff and co-workers<sup>37</sup>, to the entropic gain associated to the counter-ion release induced by the polyacrylate chain/BSA interactions. Their argument was that no diffusion took place in a medium containing 0.1 mol.L<sup>-1</sup> of sodium chloride. In our case, the salt concentration was 0.15 mol.L<sup>-1</sup> and the protein/particle interactions were still observed. Hence, it is quite likely that electrostatic interactions should be ruled out. Thus, one should take into account the hydrophobicity of the neutralized segments of the polyelectrolyte complexes, which could be favorable interacting sites with the proteins. Moreover, the chitosan/IgA assemblies could also be stabilized by hydrogen bonds.

The binding affinity of the particle for the protein, Figure 6 and Figure 3-SD, is slightly less for the CS-HP particles than for the CS-DS and this is particularly obvious in the case of the anti- $\alpha 4\beta 7$  IgA, Figure 3-SD b, where the loading yield varied from 75 to 100%. The maximum amount of bound antibody was 80 mg.g<sup>-1</sup> (protein/particles) obtained for the highest protein concentration and lowest particle solid content for both systems. For the anti- $\alpha 4\beta 7$  IgA and the CS-HP carriers, the maximal load was only 60 mg.g<sup>-1</sup> (protein/particles), thus illustrating the impact of the chemical nature of the polyanion, despite its presence in default in the colloidal assemblies, with regards to chitosan.

### 3.6. In-vitro assessment of IgA recognition properties

After immobilization, the IgA recognition abilities were measured as percent of those of the free antibodies. Two days after the immobilization process, the antibodies had retained 90-100% of their activities. After 8 days of storing in PBS at 4°C at 0.1 % of PSC and 20 µg/mL of IgA, 90% and 70% of the activities of respectively anti-OVA and anti- $\alpha 4\beta 7$  IgAs were maintained. These data are quite encouraging for potential further developments.



**Figure 8.** Bioactivities of anti-OVA and anti  $\alpha 4\beta 7$  IgAs, adsorbed on CS-DS and CS-HP particles.  CS-DS 0.1%, anti-OVA 20 µg/mL,  CS-HP 0.1%, anti-OVA 20 µg/mL,  CS-DS 0.1%, anti-a<sub>4</sub>b<sub>7</sub> 20µg/mL,  CS-HP 0.1%, anti-a<sub>4</sub>b<sub>7</sub> 20µg/mL.

### 3.7. Efficiency of AMP encapsulation into DS/CH and Hp/CH particles

The model drug used was AMP, a molecule chemically closely related to Tenofovir, an antiretroviral drug used against the HIV virus.

The entrapment of a molecular drug via the controlled complexation process was quite challenging due to the presence of 2M NaCl and to the dialysis process. The presence of sodium

chloride could impede the interactions between the drug and the polymer, and there was a risk that the AMP molecule could diffuse through the pores of the membrane. So, for the dialysis step, we selected a low cut-off membrane ( $100 \text{ g.mol}^{-1}$ ). A blank experiment (dialysis of the model drug solution at the same concentration as for the entrapment, but without polymers) showed that no drug was lost during this process.

The loading efficiency was determined via two independent methods, i) after re-dissolution of the particles isolated by centrifugation, and ii) by the depletion method *i.e.* by determining the free drug in the supernatant after particle separation and calculating the encapsulated amount by difference with the original input. Both methods provided consistent data, for the two types of colloidal complexes, the loading yields decreased with increasing input of AMP, though the loading capacity increased.

Very interestingly, even at high loading, the presence of the drug only slightly increased particles sizes, with a greater effect for the heparin-based colloids. Worth noting is that in the absence of AMP, particles were much smaller with the low cut-off membrane than with the higher one used for data in Figure 2. This result has been reproduced by 5 independent experiments and, though it is not fully understood yet, it could be attributed to a reduction of the matter flux through the low cut-off membranes, allowing the macromolecules to assemble in conditions even closer to equilibrium.



**Table 2.** Efficiency of AMP encapsulation into CS-DS and CS-HP particles. PSC at 1.5%.

$m_{AMP}/m_{CS}$ (%)	Charge ratio ( $NH_3^+/PO_4^-$ )	AMP loaded determined by redissolution (%)	AMP loaded determined from supernatant (%)	AMP loaded (mg).g <sup>-1</sup> (Particle)	Particles/AMP size (nm)	Particles/AMP size (nm) after one week at RT
<b>Chitosan / dextran sulfate particles at 1.5%</b>						
0%	-	-	-	-	547	456
10%	9.14	71	74	57.7	701	688
20%	4.57	62	61	100.1	549	524
30%	3.04	48	48	116.5	648	643
50%	1.83	46	47	187.2	587	590
<b>Chitosane/Heparin particles at 1.5%</b>						
0%	-	-	-	-	370	372
10%	9.15	67	66	51.6	643	616
20%	4.56	56	58	88.8	570	571
30%	3.04	51	49	114.8	545	553
50%	1.83	44	46	173.8	567	549

### **Conclusion**

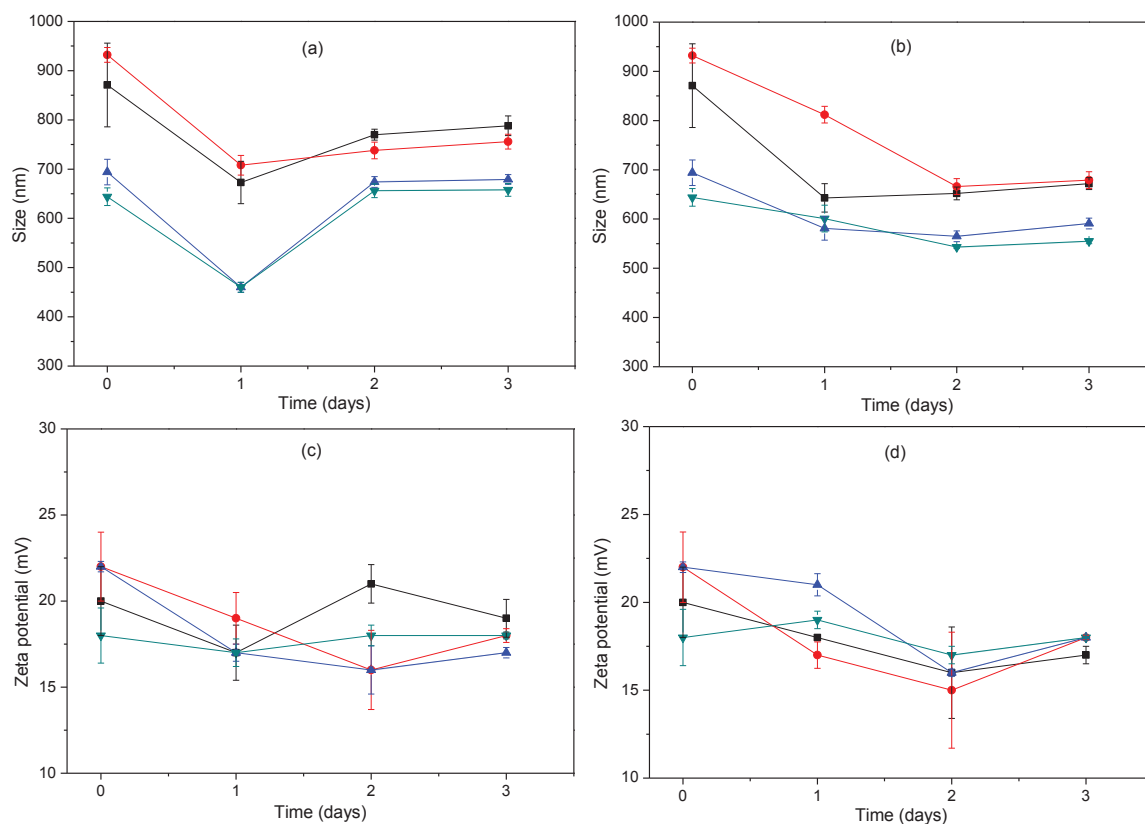
In this work we established that the controlled complexation of polyelectrolytes was a versatile method to produce colloids of great potentialities of applications in nanomedicine. The obtained particles maintained their colloidal stability in physiological conditions of salt concentration and pHs for over 30 days, they could be functionalized at their interface by proteins as targeting agents, and high loads of active molecular drug could be encapsulated, with no alteration of their colloidal characteristics.

Two different sulfated polysaccharides, namely dextran sulfate and heparin were used efficiently and, on a process standpoint, the low cut off dialysis membranes provided particles of sizes inferior to 600 nm, with no need to let the dispersion equilibrate, as it was the case for high-cut off membranes. The polymer chains within the colloidal complexes were under the form of rigid rods as shown by the SAXS experiments, proving that the complex formation under controlled assembly conditions was sufficiently close to equilibrium to allow the rearrangement of the polyelectrolyte macromolecules to a ladder-like conformation rather than a random scrambled egg assembly.

The complexation appears as a formulation process with great potentials of applications and also for some more fundamental work. For instance, the impact of the nature of the salt on the particle forming process and on the structural organization of the complexes could be investigated, as well as the evolution of the structure during the dialysis process. On the application side, further investigations are ongoing to assess the efficiency of these colloids for the delivery and the targeting of antiretroviral drugs.

Finally the scope of this controlled complexation process could be widened to other polysaccharides and also to other materials like macro-hydrogels for instance.

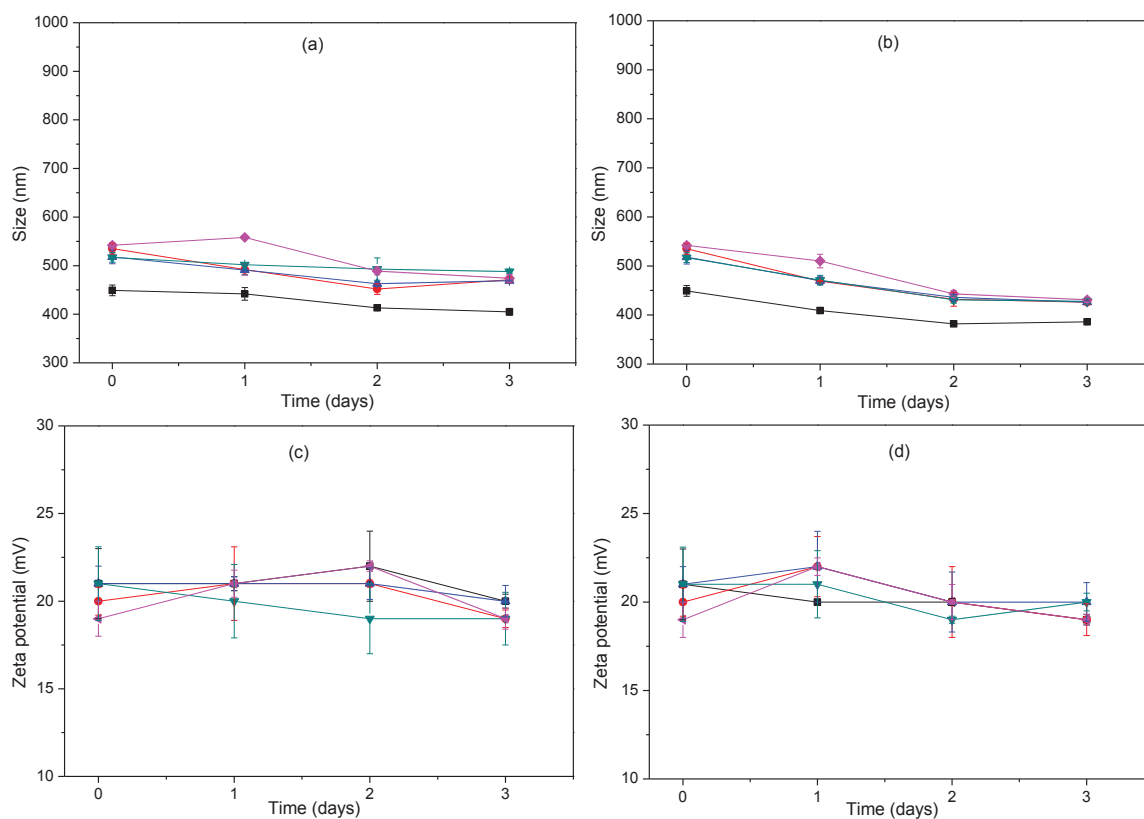
## SUPPLEMENTARY DATA

*1. CS-DS colloidal stability in hydrochloride acid at pH 1.2*

**Figure 1-SD.** Colloidal stability over time for CS-DS particle dispersed in hydrochloride acid at pH 1.2.

Size of CS-DS particles stored at (a) RT, (b) 37°C, and zeta potential at (c) RT, (d) 37°C. ■ PSC 3%, ● PSC 1.5%, ▲ PSC 1%, ▼ PSC 0.1%. The error bars correspond to the standard deviation of 5 independent measurements for each sample.

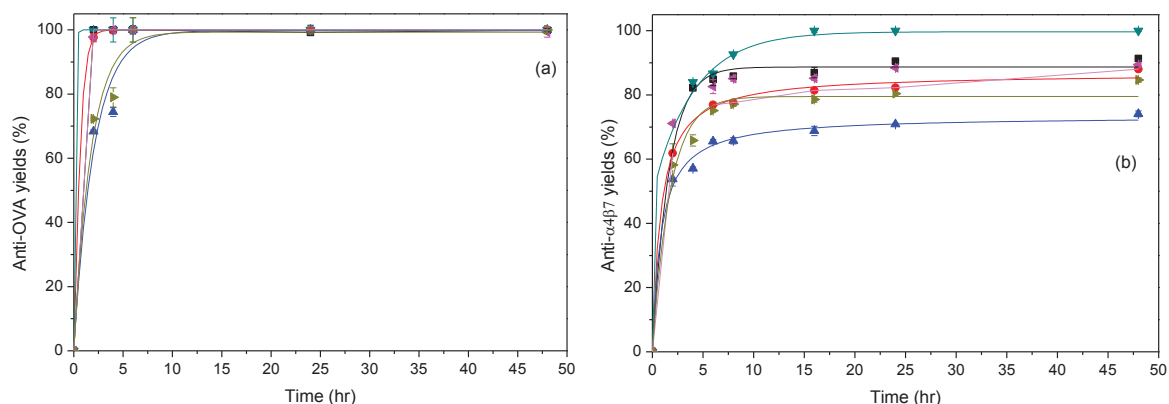
## 2. CS-HP colloidal stability in hydrochloride acid at pH 1.2



**Figure 2-SD.** Colloidal stability over time for CS-HP particle dispersed in hydrochloride acid at pH 1.2.

Size of CS-HP particles stored at (a) RT, (b) 37°C, and zeta potential at (c) RT, (d) 37°C. ■ PSC 4%, ● PSC 3%, ▲ PSC 1.5%, ▼ PSC 1%, ◆ PSC 0.1%. The error bars correspond to the standard deviation of 5 independent measurements for each sample.

### 3. CS-HP colloidal stability in hydrochloride acid at pH 1.2



**Figure 3-SD.** Adsorption kinetic of adsorption of IgAs on CS-HP particles: (a) anti-OVA /CS-DS, (b) anti-α4β7/CS-DS. PSC 0.1%: ■ IgA 10 μg/mL, ● IgA 20 μg/mL, ▲ IgA 40 μg/mL. PSC 0.05%: ▼ IgA 10 μg/mL, ▲ IgA 20 μg/mL, ▲ IgA 40 μg/mL. Each data point corresponds to the average of 3 measurements ± SD.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge for their assistance and technical expertise: Agnès Crépet and the SEC Platform of the Institut de Chimie de Lyon for SEC analysis, Pierre Alcouffé and the Centre Technologique des Microstructures - Université Claude Bernard Lyon 1 (<http://microscopies.univ-lyon1.fr/>) for electron microscopy, Céline TERRAT (Institut de Biologie et Chimie des Protéines) for ELISA test, and all the BM2-D2AM staff for the SAXS/WAXS experiments at ESRF. MC is also grateful to the ANR project PECSDDeli for her PhD grant.

## REFERENCES

1. Bernkop-Schnürch, A. & Dünnhaupt, S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **81**, 463–9 (2012).
2. Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 24–36 (2012).
3. Park, J. H., Saravanakumar, G., Kim, K. & Kwon, I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 28–41 (2010).
4. Agrawal, P., Strijkers, G. J. & Nicolay, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 42–58 (2010).
5. Amidi, M., Mastrobattista, E., Jiskoot, W. & Hennink, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 59–82 (2010).
6. Senel, S. & McClure, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1467–80 (2004).
7. Torchilin, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 302–315 (2012).
8. Hartig, S. M. *et al.* Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharm. Res.* **24**, 2353–69 (2007).
9. Agnihotri, S. a, Mallikarjuna, N. N. & Aminabhavi, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release* **100**, 5–28 (2004).
10. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M. & Chiellini, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 981–1014 (2011).
11. Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *J. Control. Release* **161**, 496–504 (2012).

12. Shu, S. *et al.* Polysaccharides-based polyelectrolyte nanoparticles as protein drugs delivery system. *J. Nanoparticle Res.* **13**, 3657–3670 (2011).
13. Hamman, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar. Drugs* **8**, 1305–22 (2010).
14. Delair, T. In situ forming polysaccharide-based 3D-hydrogels for cell delivery in regenerative medicine. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1013–1019 (2012).
15. Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C. & Delair, T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* **5**, 1882–92 (2004).
16. Schatz, C. *et al.* Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir* **20**, 7766–78 (2004).
17. Costalat, M., David, L. & Delair, T. Reversible controlled assembly of chitosan and dextran sulfate: A new method for nanoparticle elaboration. *Carbohydr. Polym.* **102**, 717–26 (2014).
18. Lackner, A. a., Mohan, M. & Veazey, R. S. The Gastrointestinal Tract and AIDS Pathogenesis. *Gastroenterology* **136**, 1966–1978 (2009).
19. Cicala, C. *et al.* The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20877–82 (2009).
20. Richman, D. D. *et al.* The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* **323**, 1304–7 (2009).
21. Vachoud, L., Zydowicz, N. & Domard, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydr. Res.* **302**, 169–177 (1997).

22. Hirai, A., Odani, H. & Nakajima, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Polym. Bull.* **94**, 87–94 (1991).
23. Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C. & Domard, A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* **4**, 641–8 (2003).
24. Polexe, R. C. *et al.* Elaboration of targeted nanodelivery systems based on colloidal polyelectrolyte complexes (PEC) of chitosan (CH)-dextran sulphate (DS). *Eur. J. Nanomedicine* **5**, 39–49 (2013).
25. Popa-Nita, S., Alcouffe, P., Rochas, C., David, L. & Domard, A. Continuum of structural organization from chitosan solutions to derived physical forms. *Biomacromolecules* **11**, 6–12 (2010).
26. Boucard, N. *et al.* Polyelectrolyte microstructure in chitosan aqueous and alcohol solutions. *Biomacromolecules* **8**, 1209–1217 (2007).
27. Beaucage, G. Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension. *J Appl Cryst* **29**, 134–146 (1996).
28. Beaucage, G. Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering. *J Appl Cryst* **28**, 717–728 (1995).
29. Beaucage, G. & Schaefer, D. W. Structural studies of complex systems using small-angle scattering: a unified Guinier/power-law approach. *J. Non. Cryst. Solids* **174**, 797–805 (1994).
30. Glatter, V. O. & Kratky, O. in *Small angle x-ray Scatt.* (Ltd., L. A. P. I.) 408 (1982).
31. Lamarque, G., Lucas, J.-M., Viton, C. & Domard, A. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: role of various structural parameters. *Biomacromolecules* **6**, 131–42 (2005).



32. Pavlov, G., Finet, S., Tatarenko, K., Korneeva, E. & Ebel, C. Conformation of heparin studied with macromolecular hydrodynamic methods and X-ray scattering. *Eur. Biophys. J.* **32**, 437–49 (2003).
33. Kirste, R. . & Oberthur, R. . in *Small-Angle X-Ray Scatt.* (London, A. P.) 408 (1982).
34. Weber, C. *et al.* Polysaccharide-based vaccine delivery systems: Macromolecular assembly, interactions with antigen presenting cells, and in vivo immunomonitoring. *J. Biomed. Mater. Res. A* **93**, 1322–34 (2010).
35. Drogoz, A. *et al.* Towards biocompatible vaccine delivery systems: interactions of colloidal PECs based on polysaccharides with HIV-1 p24 antigen. *Biomacromolecules* **9**, 583–91 (2008).
36. Van der Lubben, I. ., Verhoef, J. ., Van Aelst, A. ., Borchard, G. & Junginger, H. . Chitosan microparticles for oral vaccination : preparation , characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer ’ s patches. *Biomaterials* **22**, 687–694 (2001).
37. Wittemann, a., Haupt, B. & Ballauff, M. Adsorption of proteins on spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**, 1671–1677 (2003).

## 2. Bilan

La complexation contrôlée de polysaccharides est une méthode polyvalente permettant la formation de colloïdes avec un fort potentiel d'application comme vecteur de molécule thérapeutique. Les particules chitosane/sulfate de dextrane et chitosane/héparine présentées dans la publication II sont stables au moins 30 jours en milieu physiologique (PBS pH 7.4) et 3 jours à pH 1.2, correspondant à celui de l'estomac, même à fort taux de solide. De plus, nous avons montré que l'interface de ces particules peut être fonctionnalisée par divers anticorps tels que l'anti-OVA ou encore un anticorps ciblant le récepteur  $\alpha 4\beta 7$  surexprimé par les cellules infectées par le VIH-1. Il a été aussi montré que la fonctionnalisation avait lieu avec conservation de la bioactivité des protéines pendant au moins 8 jours après adsorption. Enfin, une drogue modèle, l'AMP a été encapsulée avec succès, en conservant le caractère colloïdal de la dispersion, renforçant ainsi le potentiel d'application de ces nanoparticules en tant que vecteur de principe actif.

L'autre conclusion majeure de cette étude concerne l'organisation structurale des complexes colloïdaux. Les analyses SAXS menées sur les particules de chitosane/sulfate de dextrane montrent que les particules ont une surface rugueuse et sont constituées de particules primaires qui pourraient correspondre à des chaînes polymères dont la configuration est sous forme de bâtonnets rigide. Ceci montrerait donc que la formation de complexe dans nos conditions d'assemblage contrôlée est suffisamment proche de l'équilibre pour permettre le réarrangement des macromolécules sous forme d'échelle biomacromoléculaire plutôt que d'un assemblage plus désordonné de type « œufs brouillés » (« scrambled eggs »).

## Conclusion deuxième partie

Dans ce chapitre, nous avons mis en œuvre pour la première fois la formation de complexes polyélectrolytes colloïdaux dans des conditions très proches de l'équilibre thermodynamique. Ainsi, ce procédé a permis de synthétiser des dispersions de complexes polysaccharidiques colloïdaux à des taux de solides trente fois plus élevés à ceux des procédés sous contrôle cinétique. De plus, ces systèmes conservent leur caractère colloïdal en conditions physiologiques. La réalisation de séries homogènes de chitosane a été indispensable pour une étude rigoureuse des propriétés en solution des polymères en fonction de la concentration en sel du milieu, étape essentielle à la mise en place de notre stratégie de complexation contrôlée de polyélectrolytes. Ainsi, il a été possible de déterminer la quantité minimale de sel nécessaire à l'écrantage des charges des deux polyélectrolytes concernés sans altérer leur solubilité. Par ailleurs, selon la concentration en NaCl d'écrantage utilisé, il est aussi possible de savoir la nature de l'objet formé après complexation. Une concentration en sel de  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  inhibe les interactions électrostatiques attractives entre les partenaires et l'élimination lente du sel par dialyse assure le rétablissement de ces interactions électrostatiques conduisant à la formation de particules colloïdales. Pour les concentrations en sel inférieures à  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ , nous avons observé la formation de macrogel ou de précipité.

Nos travaux montrent que la complexation contrôlée est une méthode simple à mettre en œuvre, respectueuse de l'environnement et non toxique, puisque sans solvant organique ni agent de réticulation chimique. Elle conduit à la formation de particules dont le potentiel d'application en tant que vecteur thérapeutique a été démontré.

Cette méthode est par ailleurs polyvalente. Elle permet aussi d'élaborer en une étape, un macrohydrogel, par la simple maîtrise des conditions expérimentales. Ce dernier aspect sera abordé dans le chapitre suivant.

## Références bibliographiques



1. Streibhardt K, U. A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* **8**, 473–480 (2008).
2. Bosch, F. & Rosich, L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* **82**, 171–9 (2008).
3. Bhattarai, N., Gunn, J. & Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **62**, 83–99 (2010).
4. Couvreur P., Dubernet C., Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles : current possibilities and future trends. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **41**, 2–13 (1995).
5. Hari Krishna Sajja, Michael P. East, Hui Mao, Andrew Y. Wang, Shuming Nie, A. & Yang, L. Development of Multifunctional Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Non-invasive Imaging of Therapeutic Effect. *Curr Drug Discov Technol* **6**, 43–51 (2009).
6. A.D. Bangham, M.M. Standish, J. C. W. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **13**, 238–252 (1965).
7. Hartig, S. M. *et al.* Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharmaceutical research* **24**, 2353–69 (2007).
8. Kreuter, J. Nanoparticles--a historical perspective. *International journal of pharmaceutics* **331**, 1–10 (2007).
9. Panyam, J. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 61–71 (2012).
10. Marian E Gindy, R. K. P. Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery* **6**, 865–878 (2009).
11. Vauthier, C. & Bouchemal, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research* **26**, 1025–58 (2009).

12. Peppas, N. A. & Carr, D. A. Impact of Absorption and Transport on Intelligent Therapeutics and Nano-scale Delivery of Protein Therapeutic Agents. *Chem Eng Sci* **64**, 4553–4565 (2009).
13. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. ., Felt, O. & Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **57**, 35–52 (2004).
14. Delair, T. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **78**, 10–8 (2011).
15. Schatz, C. *et al.* Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **20**, 7766–78 (2004).
16. Chen, Y., Mohanraj, V. J., Wang, F. & Benson, H. a E. Designing chitosan-dextran sulfate nanoparticles using charge ratios. *AAPS PharmSciTech* **8**, E98 (2007).
17. Vachoud, L. Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydrate Research* **302**, 169–177 (1997).
18. Sorlier, P., Denuzière, a, Viton, C. & Domard, a. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* **2**, 765–72 (2001).
19. Lamarque, G., Lucas, J.-M., Viton, C. & Domard, A. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: role of various structural parameters. *Biomacromolecules* **6**, 131–42 (2005).
20. Allan, G. G. & Peyron, M. Molecular weight manipulation of chitosan II : prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research* **277**, 273–282 (1995).

21. Allan, G. G. & Peyron, M. Molecular weight manipulation of chitosan. I: Kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate research* **277**, 257–72 (1995).
22. Tømmeraas, K., Vårum, K. M., Christensen, B. E. & Smidsrød, O. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohydrate research* **333**, 137–44 (2001).
23. Pillai, C. K. S., Paul, W. & Sharma, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* **34**, 641–678 (2009).





Troisième partie.

Les complexes hydrogels à base  
de polysaccharides

---



## I. Introduction

La formation, exclusivement dans l'eau et sans agent de réticulation, de gels à base de biopolymères a fait l'objet de nombreux travaux. Les premiers gels physiques à base de polysaccharides sans utilisation d'agent liant ont été obtenus par acétylation du chitosane avec différents anhydrides dans un milieu hydro-alcoolique<sup>1-4</sup>. Vachoud et al.<sup>5</sup> ont étudié la formation de ce genre de matériaux à partir de la N-acétylation du chitosane avec l'anhydride acétique dans une solution contenant une équiproportion d'eau et de 1,2-propanediol et ce pour obtenir des gels de chitine. Montembault et al.<sup>6</sup>, ont élaboré des hydrogels physiques de chitosane par deux méthodes différentes. La gélification se fait soit à partir de l'évaporation d'un mélange comprenant une solution de chitosane et du 1,2-propanediol soit par la neutralisation des charges du chitosane après une mise en contact de la solution sous vapeur d'ammoniac. Les gels ainsi obtenus ne contiennent que de l'eau et de chitosane.

La complexation de polyélectrolyte est une autre technique permettant l'élaboration d'hydrogels physiques à base de polysaccharides. L'absence d'agent de réticulation, de catalyseur et le fait de travailler exclusivement dans l'eau offrent de nombreuses perspectives, en particulier dans le domaine biomédical grâce à l'utilisation de polymères naturels, généralement biocompatibles<sup>7,8</sup>. Les hydrogels obtenus par cette voie sont formés par des interactions électrostatiques entre deux polymères de charges opposées. Ce sont des hydrogels physiques puisque les nœuds de réticulation sont des paires d'ions. Comme décrit dans la première partie de ce manuscrit, la formation des complexes hydrogels dépend des paramètres structuraux des polymères (masse molaire, densité de charge, ratio de charge ( $n^+/n^-$ )) et des conditions expérimentales (force ionique, pH, concentration en polymère).

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la formation de complexes macro-hydrogels de chitosane et de sulfate de dextrane ou d'héparine. Nous montrerons que les paramètres les plus importants dans le contrôle de la formation de ces hydrogels sont la force ionique du milieu et le rapport de charges  $n^+/n^-$ .

## **II. Publication 3: « Macro-hydrogel versus nanoparticle formation by the controlled polyelectrolyte complexation of polysaccharides »**

L'étude expérimentale menée au paragraphe II-2 a montré que l'ajout d'une solution de sulfate de dextrane dans une solution de chitosane, contenant tous deux du sel à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  conduit spontanément à la formation d'un macrogel à cause de l'écrantage partiel des charges des polyélectrolytes. A une concentration en sel égale ou supérieure à  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ , les interactions électrostatiques entre les polymères sont écrantées, ce qui permet le contrôle de leur association ultérieure. La formation de colloïdes par cette méthode de complexation contrôlée a été largement démontrée dans le chapitre précédent. La publication suivante vise à montrer la polyvalence de ce procédé en le transposant à l'élaboration de macro-hydrogels. Ainsi l'importance du rapport de charge  $n^{+}/n^{-}$  sur la nature des objets formés (particule ou macrogel) sera discutée. Par ailleurs, pour mieux comprendre le processus de gélification dans les deux cas cités précédemment (spontané ou contrôlé) une étude morphologique et organisationnelle des macro-hydrogels obtenus à divers niveaux d'échelle ont été menées.

## **Macro-hydrogel versus nanoparticle formation by the controlled polyelectrolyte complexation of polysaccharides**

*M. Costalat,<sup>†</sup> P. Alcouffe<sup>†,ε</sup>, L. David,<sup>†</sup> and T. Delair<sup>†</sup>*

<sup>†</sup>Ingénierie des Matériaux Polymères, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, UMR CNRS 5223 IMP, 15, Bd, A. Latarjet, Bât. Polytech, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>ε</sup> Centre Technologique des Microstructures, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Corresponding author information. Email [Thierry.Delair@univ-lyon1.fr](mailto:Thierry.Delair@univ-lyon1.fr)

**ABSTRACT:** The controlled complexation of oppositely charged chitosan (CS) and dextran sulfate (DS) or heparin (HP) led either to nanoparticles or macro-hydrogels, at room temperature and without cross-linker. The control of the assembly process was achieved using 2 mol.L<sup>-1</sup> NaCl to screen the electrostatic interactions during mixing of the polyanion and polycation solutions. The assembly occurred during subsequent dialysis. Macrohydrogels were only formed in the presence of an excess of polyanion. Conversely, when the chitosan polycation was in excess, colloidal nanogels were exclusively obtained. At salt concentrations lower than 1 mol.L<sup>-1</sup>, the spontaneous gelation provided macro-hydrogels, whatever the polyion in excess. Rheology measurements showed a similar elastic behaviour for CS-DS and CS-HP hydrogels, though CS-HP hydrogels appeared less cohesive. SAXS experiments revealed an aggregate morphology with internal and surface structure depending on the degree of acetylation (*DA*) of chitosan.

**KEYWORDS:** Chitosan, Dextran sulfate, Heparin, Macro-hydrogel, particle, polyelectrolyte complexes.

## 1. Introduction

The complexation of oppositely charged polyelectrolytes is one route to elaborate non-toxic polysaccharide-based hydrogels<sup>1</sup>. No auxiliary molecules such as catalysts, crosslinkers nor initiator are needed<sup>2</sup>. Moreover, the use of water as a reaction medium favors the biocompatibility of the material and thus avoids tedious purification steps prior to administration. Hydrogel formed by this technique are defined as physical hydrogel since no chemical reaction was involved in the elaboration of the network, but only electrostatic interactions<sup>2-5</sup>. Many experimental parameters can influence the formation of hydrogels complexes, including the charge molar ratio and the concentration of polyelectrolytes. The ability of a polyanion and a polycation to react and form hydrogels may also be influenced by the polyelectrolyte intrinsic parameters, such as molar mass, charge density etc. Many various natural polymers have been reported to be used as polyanions, like alginates<sup>6</sup>, pectin<sup>7</sup>, collagen<sup>8</sup> or DNA<sup>9</sup>. In the meantime, chitosan is the most widely used polycation from biomass. Previous investigations reported the practical elaboration of macrohydrogel of chitosan and dextran sulfate by boiling the polysaccharide solutions containing NaCl, mixing them and the gels actually formed on cooling<sup>10,11</sup>. The heating step was carried out to reduce the solution viscosities and the presence of salt prevented the precipitation polyelectrolyte complexes on mixing both boiling solutions.

In this work we showed that the polyanion-polycation assembly could be modulated by screening electrostatic interactions only, using sodium chloride in the solutions, and restoring them via dialysis. This controlled association could provide either dispersed materials or macro-hydrogels depending on the molar charge ratio ( $n^+/n^-$ ). The morphologies, nanostructures and viscoelastic behaviors of the obtained materials were also characterized.

## 2. Experimental section

### 2.1. *Materials*

The initial chitosan produced from chitin squid pens, batch type 112, with  $M_w$  656 000 g.mol<sup>-1</sup> and degree of acetylation of 2.5% was purchased from Mahtani chitosan Pvt. Ltd. Before all experiment, the sample was purified by successive filtrations through Millipore membranes of decreasing porosity: 3, 1.2, 0.8 and 0.45  $\mu$ m. Purified chitosan was then N-acetylated with acetic anhydride in a hydro alcoholic mixture according to the procedure described by

Vachoud and al.<sup>12</sup> The polymer was recovered from the reaction mixture by precipitation, rinsing with de-ionized water and freeze drying.

Chitosans of various molar masses were obtained by depolymerization of the parent sample by nitrous deamination. Chitosan was dissolved at 0.5% (w/v) in a 0.2 mol.L<sup>-1</sup> acetic acid/0.15 mol.L<sup>-1</sup> sodium acetate buffer. A 1 g.L<sup>-1</sup> sodium nitrite was added to the chitosan solution to obtain a nitrite/glucosamine units molar ratio of 0.1. The reaction was performed under high mechanical stirring at different time to obtain chitosans with given DA in a wide range of  $M_w$ . After the appropriate reaction time, the chitosan samples were recovered by precipitation with ammonia (pH 9-10), followed by repeated washings with deionized water until neutrality. Finally, the samples were lyophilized.

Dextran sulfate sodium salt and heparin sodium salt from porcine intestine were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and were used without further purification. The average molar mass of these polyanions were determined by gel permeation chromatography, according to our previous work<sup>13</sup>. The weight average molar mass of dextran sulfate was  $1.28 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1} \pm 5000$  with a polydispersity index,  $I_p$  of  $1.9 \pm 0.03$ . Heparin weight average molar mass was  $1.8 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1} \pm 5000$  with a polydispersity index,  $I_p$  of  $1.03 \pm 0.1$ . The water content was determined by thermogravimetric analysis (TA Instrument TGA Q500). The number of sulfate moieties per glucosidic unit for each sample was determined by colloidal titration using toluidine blue. The degree of sulfation was 2.1 for dextran sulfate and 3.18 for heparin.

## **2.2. Methods.**

### **2.2.1. Characterization of chitosan**

The Degrees of Acetylation (DA) were determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy (Brucker Avance III 400 MHz) at 25°C according to the method developed by Hirai et al.<sup>14</sup> The water content was determined by thermogravimetric analysis (TA Instrument TGA Q500). The weight average molar mass  $M_w$  and the polydispersity indexes ( $I_p$ ) were measured by size exclusion chromatography (2500 and 6000 PW TSK gel columns from Tosohaas) coupled on-line with a differential refractometer (Wyatt Optilab T-rEx) and a multiangle laser light scattering detector (Wyatt Dawn EOS) operating at  $\lambda = 633 \text{ nm}$ . A degassed 0.2 M acetic



acid/0.15M ammonium acetate buffer with a pH 4.5 was used as the eluent. The flow rate was maintained at 0.5 ml/min. The values of the refractive index increments ( $dn/dc$ ) were determined independently for each degree of acetylation according to a previous study<sup>15</sup>.

### 2.2.2. Polyelectrolyte complexation

Chitosan was dispersed at 1.5% (w/v) or 3% (w/v) in deionized water taking into account the residual water. The dissolution was achieved under mechanical stirring by adding a stoichiometric amount of acetic acid with respect to the free amine groups corresponding to the degree of acetylation used. The pH was adjusted to 4.0 with 0.1 mol.L<sup>-1</sup> acetic acid. Then, sodium chloride was added to reach concentrations up to 2 mol.L<sup>-1</sup> in the chitosan solutions. The chitosan/salt mixtures were stirred 24 hrs prior any use to form hydrogels.

Dextran sulfate and heparin solutions at 1.5% (w/v) or 3% (w/v) were prepared in deionized water, the pH was adjusted and the same concentration of salt was added.

#### *a) Controlled polyelectrolyte assembly*

This route consisted in adding dextran sulfate or heparin solution containing 2 mol.L<sup>-1</sup> sodium chloride, at a charge molar ratios ( $n^+/n^-$ ) of 0.2, 0.5, 1, 2 or 3 in one shot into a chitosan solution, at the same salt concentration, under magnetic stirring of 800 rpm. The resulting mixing solution was then poured into a dialysis bag with a Spectra/Por® membrane at a molecular cut off (MWCO) of 6,000 to progressively remove the electrolytes and thus allow the assembly of the two oppositely charged polymers. First, the dialysis was carried out against deionized water containing 150 mM NaCl. The dialysis bath was changed every hour and, simultaneously, the salt concentration was reduced by half, till nil. After that, water was changed every two hours over 5 hours.

#### *b) Spontaneous polyelectrolyte assembly*

This route consisted in adding the dextran sulfate solution to the chitosan solution, under a constant magnetic stirring of 800 rpm in order to reach a molar charge ratio ( $n^+/n^-$ ) of 2.0; both solutions being prepared with sodium chloride content ranging from 0.5 to 1 mol.L<sup>-1</sup> according to Costalat et al<sup>16</sup>. In this study, salt concentration used was set to 0.9 mol.L<sup>-1</sup>. For

SAXS analysis, the obtained macrohydrogel was dialyzed against deionized water for 5 hours, using the same membrane as above, and changing the water bath every hour during the first three.

### 2.2.3. Hydrogel characterization

#### 2.2.3.1. *Small angle X-ray scattering*

Small angle X-ray scattering (SAXS) experiment was performed at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) on the BM2-D2AM beamline. The macrogels samples were put in silica cylindrical tubes (internal diameter 2 mm, wall thickness 0.2 mm, 7.6 cm long, from Deutero GmbH, ref. 2000942) with elastomer closure caps to avoid water evaporation (Deutero ref. 2960415). The incident photon energy was tuned to 16.000 keV and a two-dimensional detector, CCD camera from Ropper Scientific, positioned at about 1.6 m from the sample was used. The primary data corrections (dark current, camera taper distortion and flat field) were achieved using the software available on the beamline. Silver behenate was used for the  $q$ -range calibration. To finish, the contribution of the solvent (tube filled with water) was subtracted to the scattered intensity of the studied samples.

#### 2.2.3.2. *Cryo scanning electron microscopy*

To carry out this morphological study, the method of cryo scanning microscopy developed by Malaise et al.<sup>17</sup> was used. One piece of hydrogel of about 2-3 mm<sup>2</sup> was set in Leica EMPact sample carrier and covered by Cryo-Fracture copper cap. The sample was rapidly immersed in slushy nitrogen at -210 °C, prepared under vacuum. This step avoided calefaction (a phenomenon of thermal insulation observed in the case of liquid nitrogen) to allow an optimal thermal conductivity. The sample was maintained in liquid nitrogen until introduction into the cryo-chamber. The device containing the hydrogel sample was then placed and tightened in a modified-freeze-fracture cryo-sample carrier<sup>17</sup> and then transferred as quickly as possible from the liquid nitrogen bath to the Gatan Alto 2500 Cryo-chamber. The sample carrier was maintained in position for several minutes to stabilize the hydrogel temperature. Then it was opened for cutting the sample leading to the opening of the “sandwiches”. The samples were maintained at a temperature ranging from -145°C to -150°C. A pre-observation was

performed to identify the regions of interest and then etched for 10 min at  $-110^{\circ}\text{C}$ . In order to obtain homogeneous plasma before final observations, samples were sputtered with platinum in the preparation cryo-chamber under adjusted argon. The observations were performed on the fractured sample with a Hitachi S800 SEM at a voltage of 5 kV and using an Everhart-Thornley secondary electrons detector (ETD).

#### 2.2.3.3. Rheology behavior

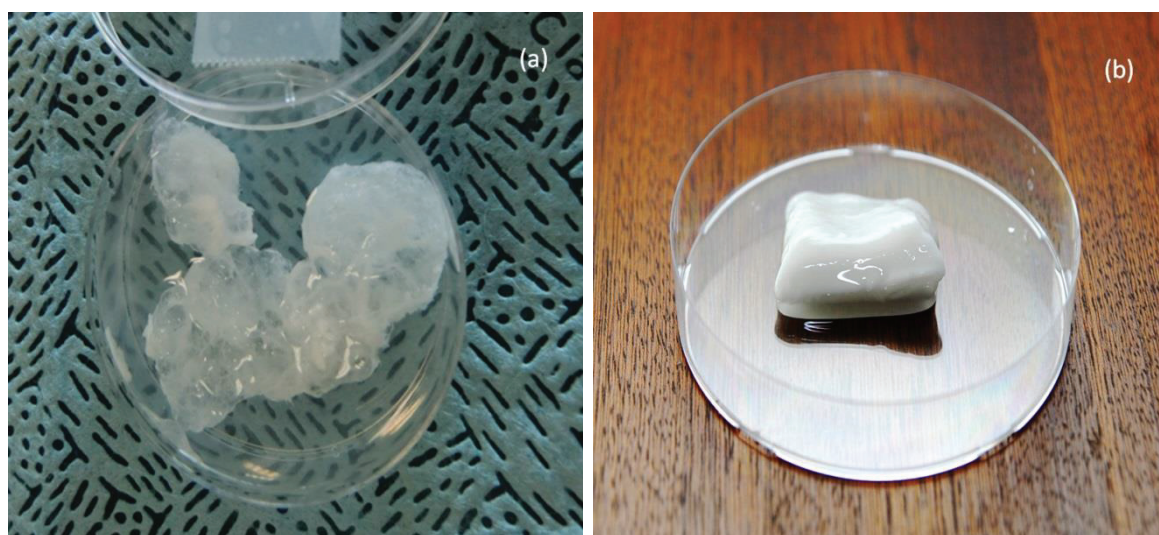
Dynamic rheological measurements were performed with a rheometer (AR 2000, TA Instruments), fitted with a plate-plate tool. The diameter of the plates was 25 mm. The gap varied from 1 to 1.5 mm. Previously to the viscoelastic characterization by frequency scanning, the values of the storage ( $G'$ ) and the loss ( $G''$ ) moduli were verified to be independent of the strain amplitude. This allowed performing all measurements within the linear viscoelastic strain range. For that, a strain sweep test at an angular frequency of 10 rad/s was performed to define the linear viscoelastic domain. The increase of the strain induced an apparent decrease of the moduli. Thus, a critical strain was determined to use a significant value of the strain staying within the linear behavior strain range. With this critical strain,  $G'$  and  $G''$  moduli were measured from a (constant strain) frequency sweep over an angular frequency range from 100 to 0.1 rad/s. All the rheological measurements were achieved at room temperature.

### 3. Results and discussion

The assembly of oppositely charged polyelectrolytes with no added salt was spontaneous, and led to a heterogeneous material, a mixture of gel and precipitate. Adding sodium chloride to the polyelectrolyte solutions in the range from 0.5 to 1 mol.L<sup>-1</sup> provided to a homogeneous material but with moderate cohesiveness (Figure 1a). Increasing this salt concentration to 2 mol.L<sup>-1</sup> afforded a limpid solution after mixing, with no assembly taking place<sup>16</sup>. The slow elimination of the salt by dialysis afforded a cohesive macrohydrogel as seen in Figure 1b. These results prompted us to get a better insight on the parameters impacting the controlled complexation of two oppositely charged polyelectrolytes.

### 3.1. Ionic strength: a key parameter for controlling the assembly of polyelectrolytes

The above-detailed preliminary experiments underlined that the ionic strength of the mixture in which the polyelectrolyte assembly occurred largely impacted the course of the reaction. Too low a salt concentration could not prevent the direct precipitation of the complexes due to an un-controlled assembly of the polyelectrolytes. A sodium chloride concentration range of the 0.5 to 1 mol.L<sup>-1</sup> led to soft homogeneous gels as a result of the partial screening of the electrostatic interactions. Increasing the salt concentration to 2 mol.L<sup>-1</sup> prevented the electrostatic assembly of the polyions as already observed<sup>16</sup>. To recover the assembly capability of the two oppositely charged polymers, the limp mixture was dialyzed against water leading to a macro-hydrogel with a massive cohesive aspect (Figure 1-b), whatever the nature of the polyanion.

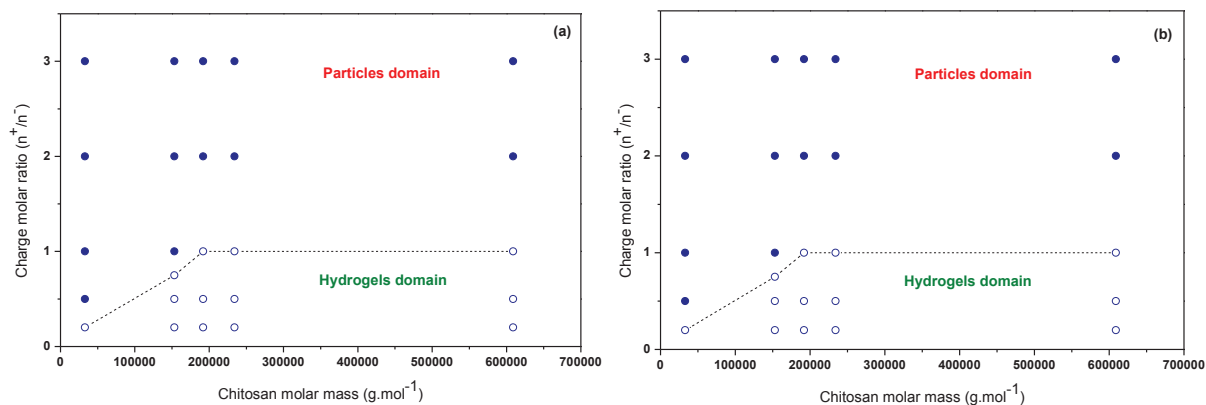


**Figure 1. Pictures of hydrogels formed by polyelectrolyte complexation:** (a) *CS-DS hydrogel* obtained from 0.9 mol.L<sup>-1</sup> NaCl and a charge molar ratio of 2 (b) *CS-HP hydrogel* obtained using 2 mol.L<sup>-1</sup> NaCl and a charge molar ratio of 0.2. (CS: Mw = 6.09×10<sup>5</sup> g.mol<sup>-1</sup>, DA= 49%, polymer concentrations = 3%). The petri dish diameter was 10 cm in (a) and 12 cm in (b).

### 3.2. Macrohydrogels versus nanoparticles selectivity by controlled complexation

#### 3.2.1 *Effect of the charge molar ratio*

Chitosans with different molar masses were synthesized and associated with dextran sulfate or heparin at different charge molar ratio. In fact, depending on this last parameter, particles or macrohydrogels could be obtained. The limit between their domains of formation with the variation of chitosan molar mass was reported in figure 2. One can see that with an excess of sulfated polyanion ( $n^+/n^- < 1$ ), the macrohydrogel was formed over a wide range of chitosan molecular masses. The gelation resulted from physical cross-linking between both polyelectrolytes, induced by an excess of sulfate moieties that interacted with the neighboring amino groups of chitosan, according to a scrambled-egg pattern. This excess of strong polyacid gelled the system by providing the physical junctions responsible for the visco-elastic properties of the material, without significant disentanglement of the polyanions. When the polysulfate was in default,  $n^+/n^- = 2$ , the formation of the particles in the mixture resulted from the disentanglement of the chitosan chains, which was faster than the formation of the network, by physical associations. Therefore, in the presence of an excess of weak polybase, a reversible assembly process occurred, allowing the necessary conformational adaptation and partial disentanglement to form particles. As a further support to this mechanism, we observed that the particles still rearranged themselves up to 10 days after dialysis<sup>16,18</sup>. Finally, it is worth noting that for a chitosan molar mass lower than  $33\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , only particles were formed, even with an excess of polyanion, underlining that the gelation strongly depended upon the density of physical cross-links per polymer chain. Interestingly, dextran sulfate and heparin had a similar behavior with chitosan, therefore, the diagram reported in figure 2 was available for both strong anionic polyelectrolytes. A further study concerning the structural evolution from the mixing polyelectrolyte solution to the hydrogel formation might certainly bring crucial informations on the mode of association of the polyelectrolyte and on the structure of the resulting assemblies.



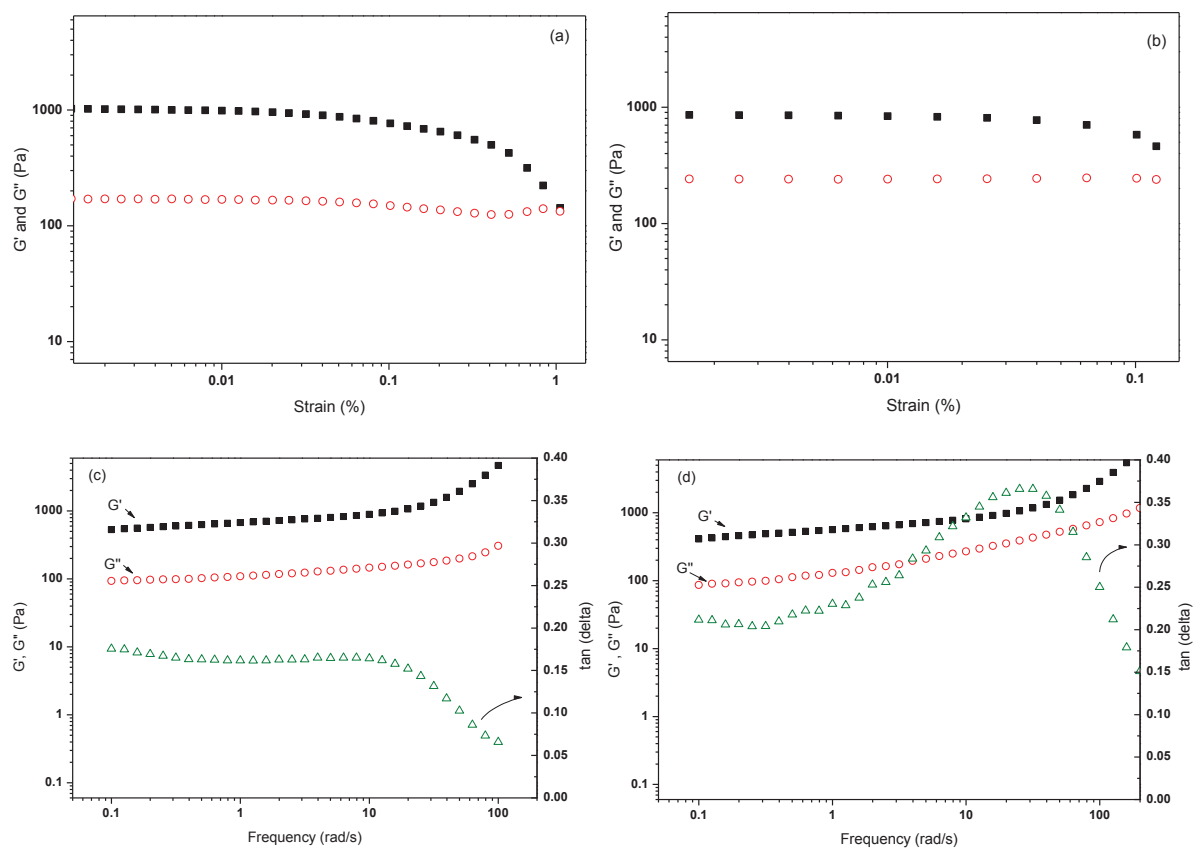
**Figure 2. Macro-hydrogels controlled association diagrams as a function of polyelectrolytes charge molar ratio ( $n^+/n^-$ ) and chitosan molar mass at (a) 1.5 (w/w) and (b) 3% (w/w) of polymer concentration.** The objects formed were ● particles or ○ macrohydrogels for both polymer concentrations. The same diagrams were available for heparin and dextran sulfate polyanions. Salt concentration used in each sample was  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  and was removed by dialysis as described in the experimental section. The result was observed on at least 5 independent experiments.

### 3.2.2 Rheological characterization of the controlled polyelectrolyte complex macro-hydrogels

To evidence the gel formation, macrohydrogels formed by the controlled route were characterized by rheology. The variations of the shear moduli  $G'$  and  $G''$  were first studied as a function of the applied strain. The moduli decreased with increasing strains (figure 3-a and 3-b). An appropriate strain was selected in the linear region for each sample for further studies. The critical strain was 0.02% for CS/DS and 0.018% for CS/HP hydrogels. This difference illustrates the role of chain entanglements in the gel behavior, short polyanionic chains of HP inducing non linearity at lower strains. The viscoelastic behaviors of CS-DS and CS-HP macro-hydrogels were further characterized at low strains in the linear regime. The variations of  $G'$  and  $G''$  moduli were performed in a sweep angular frequency scan (figure 3c and d). During this measurement,  $G'$  remained superior to  $G''$  for both polyanions. This indicated a constant domination of the elastic properties which were comparable to a pure chitosan physical hydrogel<sup>19,20</sup>. However, the gel behavior appeared better for chitosan/dextran sulfate where  $\tan(\delta) = G''/G'$  was below 0.15. For CS-HP hydrogels,  $\tan(\delta)$  remained above this value indicating a weaker cohesiveness of the material. Again, the

high molar mass of dextran sulfate induced a stronger network than the low molar mass heparin.

At equilibrium in the low angular frequency limit, one can define a plateau value of storage modulus  $G_e$  with a value about 950 Pa for CS-DS and 860 Pa for CS-HP. At the same concentration of polymer and for a constant  $DA$  around 37%, this equilibrium moduli presented a value about 5000 Pa for hydrogels obtained by the alkaline neutralization of a chitosan solution<sup>19</sup>. Thus, the slow polyelectrolyte association kinetics of the controlled complexation led to a weaker network, possibly with a higher number of disentangled chains, than with the direct neutralization method.

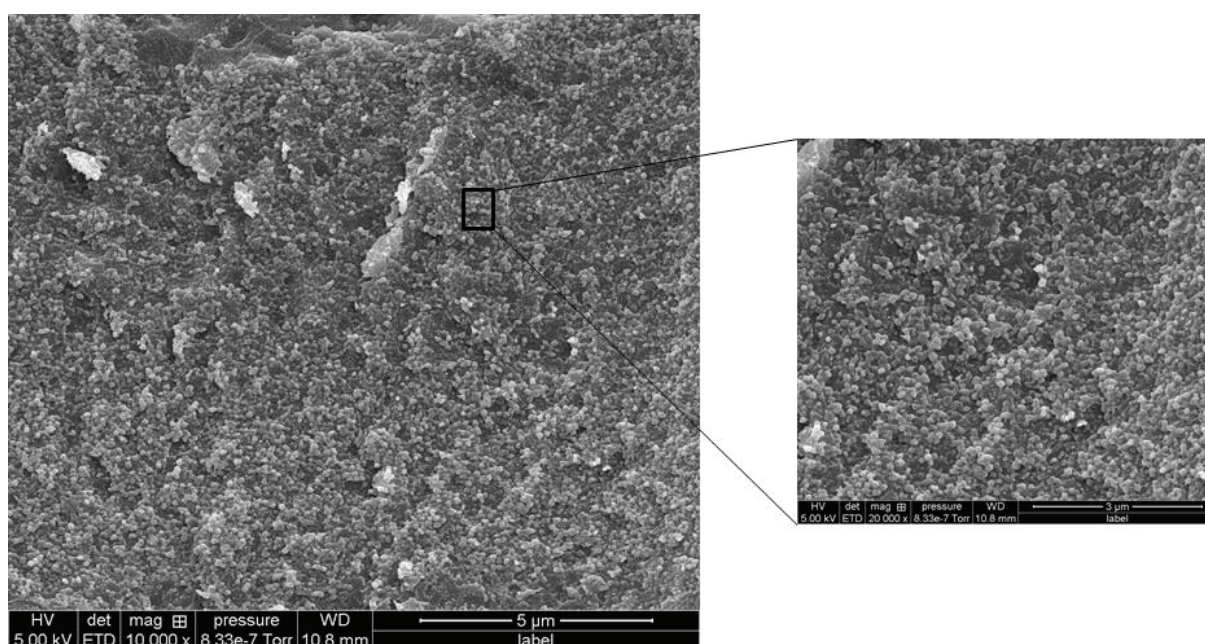


**Figure 3. Variation of  $G'$  and  $G''$  moduli as a function of strain at a setting angular frequency of 10 rad/s (a) CS-DS and (b) CS-HP and as a function of angular frequency at a setting maximal strain of 0.02%, (c) CS-DS and (d) CS-HP. Macro-hydrogels complexes obtained after dialysis of a 2 mol.l<sup>-1</sup> salt concentration and a charge ratio ( $n^+/n^-$ ) of 0.2. ■  $G'$ , ○  $G''$  and △  $\tan(\delta)$ . Chitosan: DA 49%, Mw =  $6.09 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>, dextran sulfate: Mw =  $12.86 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>, heparin: Mw =  $1.8 \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup>, and polymer concentration = 3% (w/v). Measurements were carried out at room temperature.**



### 3.2.3 Morphology and nanostructure of the controlled polyelectrolyte complex macro-hydrogels

The morphology of the hydrogel complexes was investigated by cryo scanning electron microscopy. The structure observed displayed a homogeneous structure composed of only sub-micrometric spherical particles (see figure 4). In the case of CS-HP presented here in Figure 4, the diameter of the spherical particles was close to 113nm. Thus, the hydrogel based on the controlled polyelectrolyte assembly presented an aggregate structure, comparable to the physical hydrogels obtained by neutralization of a chitosan solution<sup>17</sup> though in this last case, the diameter of the aggregates were closer to 150 nm (gelation from aqueous solution)<sup>17</sup>.



**Figure 4. Cryo scanning electron microscopy of CS-HP macro-hydrogel obtained from controlled complexation using 2 mol.L<sup>-1</sup> NaCl and a charge molar ratio of 0.2. (CS: Mw = 6.09×10<sup>5</sup>g.mol<sup>-1</sup> DA=49%, concentration = 3%; HP Mw 1.8×10<sup>4</sup> g.mol<sup>-1</sup> and sulfate content 3.1).**

Small angle X-ray scattering was then performed to investigate the internal organization of the CS-HP macro-hydrogels elaborated from chitosan with a DA of 49% (figure 5-a). The scattering behavior of CS-HP hydrogel was reported in Figure 5 in log-log scales. As discussed previously, the controlled complexation can lead either to particles or macrohydrogels for both polyanions, depending mainly on the charge molar ratio. Since the experimental conditions were the same, the scattered patterns obtained for the CS-HP hydrogel could be compared to the CS-DS particles (see figure 5-b). Thus, the pattern could



be again divided in two scattering domains, which were analyzed with the Porod laws, i.e.  $I(q)=C_1/q^{\alpha_1}$  at low  $q$  values at  $q<0.03\text{\AA}^{-1}$  and  $I(q)=C_2/q^{\alpha_2}$  in the high  $q$  range up to  $0.25\text{\AA}^{-1}$ . The scattering behavior of CS-HP hydrogel was similar to CS-DS colloids<sup>18</sup>. SAXS data of figure 5 for both systems can only reveal the surface organization and/or the internal structure of larger aggregates<sup>21–23</sup> as evidenced in figure 4. Therefore, the exponents of the generalized Porod's laws ( $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ ) are reported in Table 1, and can be used to quantify the scattering behavior of both materials in the low and high  $q$ -ranges.

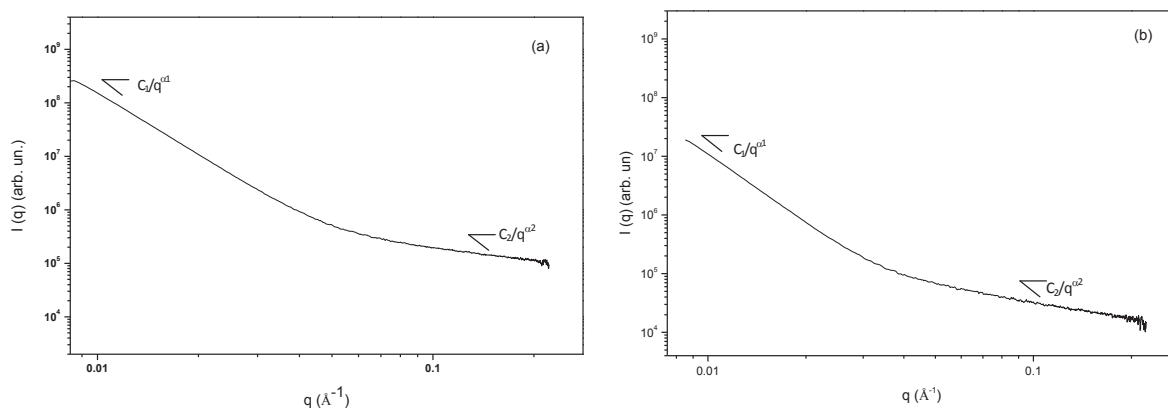
**Table 1. Values of Porod exponents  $\alpha_1$  at low  $q$  and  $\alpha_2$  at high  $q$  values determined by small angle X-ray scattering.** CS-HP hydrogels and CS-DS particles formed from 2 mol.L<sup>-1</sup> salt screening concentration, 3% (w/v) of polymers and chitosan at DA = 49%.

	SSC (mol.L <sup>-1</sup> )	Concentration on polymer % (w/v)	$\alpha_1$	$\alpha_2$
CS-HP macrohydrogel	2	3	3.82	1.07
CS-DS <sup>18</sup> particles	2	3	3.89	0.88

The exponent  $\alpha_1$  was 3.82 and 3.89 for CS-HP hydrogel and CS-DS particles respectively. These values close to the ideal exponent of 4 valid for perfectly smooth surface with sharp electron density variation across the surface.

A slightly different scattering regime is present in the higher  $q$  range with scattering exponents close 1.07 for CS-HP hydrogel and 0.88 for CS-DS particles respectively. These analyses evidenced a difference in the structure of the elementary rod-like scatters that could be due to the increase of rigidity of rod-like chitosan/polyanion associations with the higher charge density and higher molecular mobility of HP vs CS.

To summarize, the controlled complexation allowed hydrogels or particles with fractal-like rough surfaces and an intra-structure composed of rod-like objects whatever the investigated polyanion.



**Figure 5. Small angle X-ray scattering analysis of (a) CS-HP macro-hydrogels obtained from chitosan with  $M_w 6.09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  and charge molar ratio ( $n^+/n^-$ ) of 0.2 and (b) CS-DS particles obtained from chitosan with  $M_w 1.33 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  and charge molar ratio ( $n^+/n^-$ ) of 2 . The polymer concentration was sated at 3% (w/v). Both objects were formed using  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  salt screening concentration. Chitosan: DA 49%; dextran sulfate:  $M_w = 12.86 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , sulfate content = 2.2 and heparin:  $M_w = 1.8 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$  and sulfate content = 3.1.**

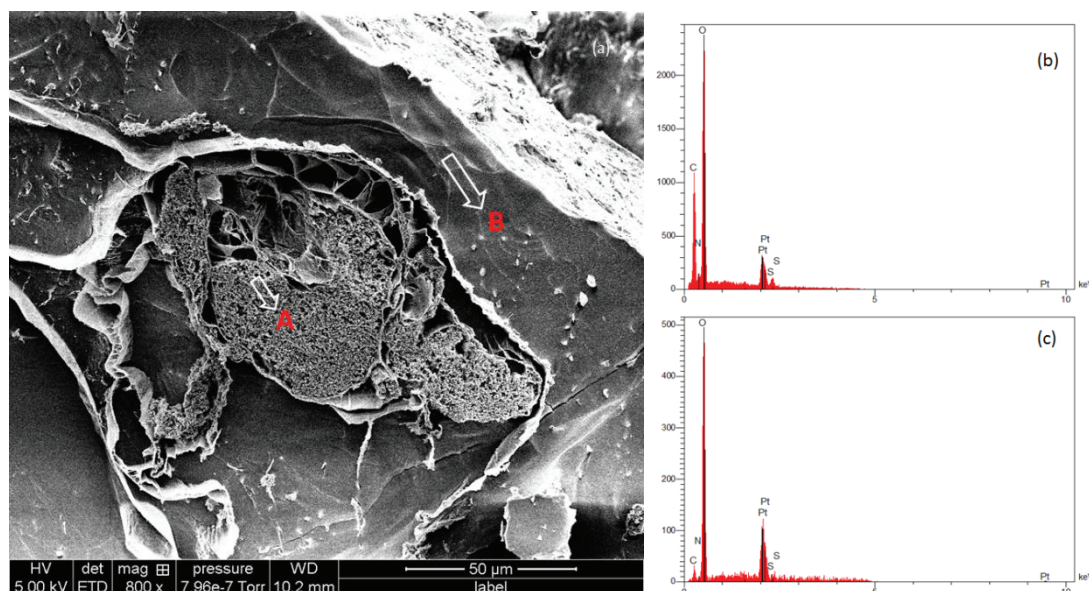
### 3.3. Macrohydrogels formed by spontaneous complexation

In this section we characterized the hydrogels resulting from the spontaneous complexation of chitosan and dextran sulfate or heparin. The morphology and the nanostructure were discussed to understand the specificity of this method.

#### 3.3.1 Morphology and nanostructure of the macro-hydrogels formed spontaneously

The spontaneous formation of macro-hydrogel did not allow a uniform complexation since the morphology observed was composed of two different domains as shown in Figure 6-a. The first one, (referred to 'A' in Figure 6-a) consisted of sub-micrometric spheres assemblies. The second one, represented in B, was composed of smooth material. The assemblies of particles observed in A domain indicated that in this area, the complexation between both polyelectrolytes involved dextran sulfate because of the presence of sulfur peak in EDX diagram (Figure 6-b) which should arise from the sulfate moieties of dextran sulfate. This peak was not very intense because of the molar charge ratio ( $n^+/n^-$ ) was 2, i.e. the polyanion was in default and thus the intensity of the signal remained low. As one can see in figure 6-c,

the sulfur pic was not present in the smooth domain (part B of figure 6-a) of the hydrogel. Moreover, the intensity of Carbone peak in Figures 6-c was less than in A domain represented in figure 6-b. One can suppose that the domain B represented an ice crystal since it is mainly composed of oxygen.



**Figure 6. Cryo scanning electron microscopy of (a) CS-DS macro-hydrogel obtained from  $0.9 \text{ mol.L}^{-1}$  NaCl and a charge molar ratio of 2. The chemical composition in (b) A domain and (c) B domain was determined by EDX analysis. (CS:  $M_w = 6.09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  DA=49%, concentration = 3%; DS  $M_w 12.86 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  and sulfate content 2.2).**

Small angle X-ray scattering was performed on CS-DS and CS-HP macrohydrogels showing a scattering behavior depending on chitosan *DA*. According to figure 7 and the quantification in Table 2, three major observations can be made: (i) first, Porod's coefficient  $\alpha_1$  increased with *DA* for CS-DS hydrogels. (ii) Second, in the case of CS-HP,  $\alpha_1$  remained constant irrespective of the *DA*s. (iii) Third, Porod's coefficient  $\alpha_2$  decreased from 2 to 1 when *DA* increased to 39%.

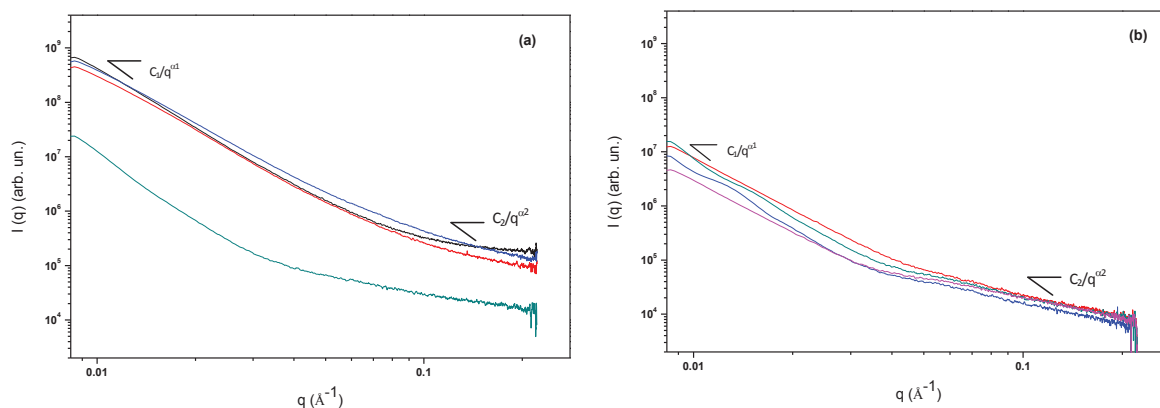
For CS-DS hydrogels with a *DA* lower than 39%,  $\alpha_1$  was close to 3, meaning that the hydrogel surfaces presented a fractal or rough surface organization. There was no clear evolution of this exponent when *DA* increased up to 33%, but at *DA* of 39%,  $\alpha_1$  values were close to 4.6, showing that the surface of the systems exhibited an interphase corresponding to a gradual

evolution of the electron density. This drastic effect of *DA* on the surface organization of the CS-DS hydrogels could be related to the variations in the conformation of the chitosan chains in the vicinity of the surface of the aggregates. As a constant charge ratio was used, the mass ratio  $M_{CS}/M_{DS}$  increased with *DA* and the chitosan in excess is likely to contribute to a shell of chitosan entrapping the polyanion/polycation complexes in the internal part of the aggregates.

A second sticking effect of *DA* on the nanostructuration of CS/DS hydrogels is visible through the evolution of  $\alpha_2$  parameters that stayed largely above unity when the *DA* was increased in the range from 26 to 33% and much closer to 1 when *DA*=39%. This evolution shows a transition from ill-defined elementary scatters to well defined rod-like objects that can be identified with the ladder-like associations only when the *DA* of chitosan enabled a solubility in a wide range of salt concentration<sup>19</sup>. When the polyelectrolyte character of chitosan was too strong, ladder-like associations were more difficult and disordered local association favored.

The results were different with CS-HP macro-hydrogel, where the scattering behavior was similar to the one formed by controlled complexation. In this case, at low *q* range, the exponent  $\alpha_1$  stayed almost the same with the variation of the *DA* between 26 and 39% (with a scattering exponent ranging from 3.2 to 3.7). Likewise, these results put forward a rough surface of CS-HP macrohydrogels.

In the higher *q* range the exponent  $\alpha_2$  was close to 1 whatever the values of *DA* showing that the ladder-like morphology was favored in presence of HP chains, i.e. polyanions of lower DP and higher linear charge density. Thus, the intra-organization was composed of rod-like elementary objects at every *DA*, in contrast to the CS/DS systems where a structural transition exist with *DA*.



**Figure 7. Small angle X-ray scattering analysis of macro-hydrogels obtained at 3% (w/v) of polymers:** (a) CS-DS and (b) CS-HP hydrogels formed with  $0.9 \text{ mol.L}^{-1}$  salt screening concentration and various DA: — DA=26%, — DA=32%, — DA=33%, — DA=39%. Mw of chitosan was sated at  $6.09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  and charge ratio (n+/n-) at 2. Dextran sulfate Mw  $12.86 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  sulfate content = 2.2 and heparin: Mw  $1.8 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ , sulfate content = 3.1.

**Table 2. Values of Porod exponents  $\alpha_1$  at low q and  $\alpha_2$  high q values determined by small angle X-ray analysis.** CS-DS and CS-HP hydrogels formed from  $0.9 \text{ mol.L}^{-1}$  salt screening concentration, 3% (w/v) of polymers and chitosan at different DA.

Hydrogel type	DA (%)	$\alpha_1$	$\alpha_2$
CS-DS	26	3.122	0.99
	32	3.120	1.20
	33	3.136	1.41
	39	4.658	1.147
CS-HP	26	3.239	1.113
	32	3.639	1.248
	33	3.266	1.218
	39	3.256	1.112

## Conclusion

The controlled polyelectrolyte complexation was achieved by screening the electrostatic interactions with sodium chloride at a concentration of  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  in the aqueous medium and subsequent dialysis of the limpid mixture against water. Two different physical forms could be obtained according to the nature of the polymer used in excess. Macrohydrogels resulted from the polyelectrolyte assembly in the presence of an excess of polyanion, whereas particle dispersions were isolated with an excess of polycation. The gelling effect of the polyacid was attributed to the excess of strong sulfate moieties forming electrostatic cross-links faster than the disentanglement of the chains. Conversely, an excess of weak base allowed the necessary conformational adaptation and chain disentanglement to yield independent particles. An in situ study of the evolution of the system from the mixing polymer solution to the object (particles or macrohydrogels) will certainly offer a better understanding of this phenomenon. Anyway, the controlled assembly process yielded cohesive macro-hydrogels composed of nano-aggregates ( $\Phi \sim 115 \text{ nm}$ ) with a rough surface and a rod-like internal organization. At last, macrohydrogels resulting from the controlled assembly process exhibited lower elastic moduli than for a chitosan physical hydrogels obtained by neutralization with a base.

At low sodium chloride concentration (beyond  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) macrohydrogels spontaneously formed as a result of the partial screening electrostatic interactions. The internal structure of these materials analyzed by SAXS depended on the *DA* of chitosan. For a *DA* below 39%, the hydrogels were composed to a fractal like rough surface and internal structure organized into an aggregation of ill-defined elementary objects. Whereas, for a *DA* superior or equal to this critical value, the structure was characterized by an interpenetrating of rod-like polymer network.

Further work will address the biological evaluation of these systems. In particular their use as scaffolds for cell culture and also for the encapsulation of drugs.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to acknowledge for their assistance and technical expertise: Agnès Crépet and the SEC Platform of the Institut de Chimie de Lyon for SEC analysis, and all the BM2-D2AM CGR group staff for the SAXS/WAXS experiments at ESRF. This work was financed by the French National funding Agency ANR through the PECSDDeli project (ANR Program: Nanotechnologies et Nanosystèmes (P2N) 2010, projet ref : ANR-10-NANO-0010).

## ABBREVIATIONS

SSC, screening salt concentration; DA, degree of acetylation

## REFERENCES

1. Tsuchidaa, E., Osadaab, Y. & Ohnoa, H. Formation of interpolymer complexes. *J. Macromol. Sci. Part B Phys.* **17**, 683–714 (1980).
2. Berger, J., Reist, M., Mayer, J., Felt, O. & Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 35–52 (2004).
3. Peppas, N. a, Bures, P., Leobandung, W. & Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27–46 (2000).
4. Peppas, N. a., Hilt, J. Z., Khademhosseini, a. & Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345–1360 (2006).
5. Peppas, N. A. *Preface: Hydrogels in medicine and pharmacy*, in: N.A. Peppas (Ed.), *Fundamentals*, vol. 1, CRC Press. (1986).



6. Kim, HJ., Lee, HC., Oh, JS., Shin, BA., Oh, CS., Park, RD., Yang, KS. & Cho, CS. Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application. *J Biomater Sci Polym Ed* **10**, 543–56 (1999).
7. Yao, K. ., Cheng, H.Tu, F., Zhang, J. . & Liu, J. pH-sensitivity of the swelling of a chitosan-pectin polyelectrolyte complex. *Angew. Makromol. Chemie* **245**, 63–72 (1997).
8. Taravel, M. N. & Domard, a. Collagen and its interactions with chitosan, III some biological and mechanical properties. *Biomaterials* **17**, 451–5 (1996).
9. Borchard, G. Chitosans for gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 145–50 (2001).
10. Sakiyama, T., Takata, H., Kikuchi, M. & Nakanishi, K. Polyelectrolyte complex gel with high pH-sensitivity prepared from dextran sulfate and chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **73**, 2227–2233 (1999).
11. Fukuda, H. & Kikuchi, Y. Polyelectrolyte complexes of sodium dextran sulfate with chitosan 2. *Macromol. Chem. Phys.* **178**, 2895–2899 (1977).
12. Vachoud, L., Zydowicz, N. & Domard, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydr. Res.* **302**, 169–177 (1997).
13. Schatz, C. *et al.* Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir* **20**, 7766–78 (2004).
14. Hirai, A., Odani, H. & Nakajima, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Polym. Bull.* **94**, 87–94 (1991).
15. Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C. & Domard, A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* **4**, 641–8 (2003).
16. Costalat, M., David, L. & Delair, T. Reversible controlled assembly of chitosan and dextran sulfate: A new method for nanoparticle elaboration. *Carbohydr. Polym.* **102**, 717–26 (2014).



17. Malaise, S. Small Diameter Vascular Substitutes Based on Physical Chitosan Hydrogels - Proof of Concept. Thesis of Université Claude Bernard Lyon 1 - Université de Lyon. (2014).
18. Costalat, M., Alcouffe, P., David, L. & Delair, T. Controlling the complexation of polysaccharides into multi-functional colloidal assemblies for nanomedicine. *J. Colloid Interface Sci.* **430**, 147–56 (2014).
19. Montembault, A., Viton, C. & Domard, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent. *Biomacromolecules* **6**, 653–62 (2005).
20. Montembault, A., Viton, C. & Domard, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials* **26**, 1633–43 (2005).
21. Beaucage, G. Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension. *J Appl Cryst* **29**, 134–146 (1996).
22. Beaucage, G. Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering. *J Appl Cryst* **28**, 717–728 (1995).
23. Beaucage, G. & Schaefer, D. W. Structural studies of complex systems using small-angle scattering: a unified Guinier/power-law approach. *J. Non. Cryst. Solids* **174**, 797–805 (1994).

### III. Bilan

Cette publication souligne les effets de la concentration en sel d'écrantage et du rapport de charges ( $n^+/n^-$ ) sur la formation, la morphologie et l'organisation interne des complexes hydrogels.

Une concentration en sel d'écrantage de  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  aboutit, après dialyse, à des objets de différentes formes physiques selon la nature du polymère en excès : une dispersion de particules lorsque le polycation est en excès et un macrohydrogel dans le cas inverse. Au regard de ces résultats préliminaires, l'hypothèse la plus probable pour expliquer la gélification en présence d'excès de polyanion est la « rapidité » des groupements sulfate à former des réseaux ioniques. Une étude *in situ* de l'évolution du système de la solution de polymères et sel à la formation de ces objets (particules ou macrohydrogels) pourra certainement étayer cette hypothèse et offrir une meilleure compréhension de ce phénomène. Quoi qu'il en soit, le processus d'assemblage contrôlé nous a permis d'élaborer des macrohydrogels cohésifs constitués de nano-agrégats ( $\sim 115 \text{ nm}$ ). Les analyses SAXS montrent que ces hydrogels ont une surface rugueuse et sont composés de chaînes enchevêtrées, organisées sous forme de bâtonnet rigide. Les modules viscoélastiques des macrogels à base de sulfate de dextrane et d'héparine sont comparables mais restent toutefois inférieurs à ceux des hydrogels de chitosane obtenus par neutralisation.

A une concentration en NaCl inférieure à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , nous avons observé la formation spontanée de macrohydrogels massifs et cohésifs en raison de l'écrantage partiel des interactions électrostatiques. La structure interne de ces matériaux analysés par SAXS dépend essentiellement du *DA* du chitosane. Pour un *DA* inférieur à 39%, ces hydrogels montrent une surface rugueuse et une structure interne composée d'objets élémentaires non définis. Pour les *DAs* supérieurs à cette valeur critique, les analyses montrent une structure interne composée de réseaux de polymères interpénétrés organisés en bâtonnet rigide.

## Conclusion troisième partie

La complexation contrôlée est une méthode permettant l'élaboration en une étape de particules colloïdales ou de macro-hydrogels. Dans le cas du sulfate de dextrane et de l'héparine, les macrohydrogels se forment exclusivement lorsque le polycation se retrouve en défaut. A partir de ces travaux, il est à présent possible de former un objet à la carte selon les applications visées. Il est cependant nécessaire de souligner que ces travaux ont été réalisés exclusivement sur des polyanions forts dont la fraction de charge est indépendante du milieu. De part leur comportement, les polyanions faibles peuvent présenter des différences selon le pH, la nature du sel utilisé, sa concentration etc.

## Références bibliographiques

---



1. Hirano, S., Kondo, S. & Ohe, Y. Chitosan gel: a novel polysaccharide gel. *Polymer (Guildf)*. **16**, 622 (1975).
2. Moore, G. K. & Roberts, G. A. F. Chitosan gels: 1. Study of reaction variables. *Int. J. Biol. Macromol.* **2**, 73–77 (1980).
3. Moore, G. K. & Roberts, G. A. F. Chitosan gels: 2. Mechanism of gelation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2**, 1978–1980 (1980).
4. Hirano, S., Matsuda, N., Miura, O. & Tanaka, T. N-Methylenchitosan gels, and some of their properties as media for gel chromatography. *Carbohydr. Res.* **71**, 344–348 (1979).
5. Vachoud, L., Zydowicz, N. & Domard, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydr. Res.* **302**, 169–177 (1997).
6. Montembault-Clayer, A. Elaboration d'hydrogels physiques de chitosane : Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage. (2004).
7. Bhattarai, N., Gunn, J. & Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 83–99 (2010).
8. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. ., Felt, O. & Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 35–52 (2004).



# Conclusion générale

---





La complexation polyélectrolyte est une méthode polyvalente particulièrement adaptée à l'élaboration de matériaux de structures diverses. De plus, elle se déroule en milieux aqueux exempts de tout solvant ou agent de réticulation organique et nécessite un apport d'énergie sensiblement plus faible que pour les procédés basés sur l'émulsification de deux phases liquides immiscibles. Adaptée aux polysaccharides, polymères naturels issus de la biomasse, biocompatibles et biodégradables, la complexation polyélectrolyte répond ainsi à de nombreux aspects du cahier des charges des matériaux à usage biomédical.

Simple à mettre en œuvre sur le plan expérimental, elle reste parfois délicate à contrôler car de nombreux paramètres ont un impact sur le cours de l'élaboration des matériaux. Cette diversité peut aussi constituer un atout du procédé car l'on peut faire varier des paramètres intrinsèques aux polyélectrolytes utilisés, tels que la masse molaire et la densité de charges, ou des paramètres extrinsèques comme les propriétés physico-chimiques du milieu d'assemblage et la cinétique de complexation.

C'est sur ce dernier aspect que nous avons focalisé notre travail car la complexation de polyélectrolytes, qui résulte de la neutralisation des charges positives et négatives des polyions impliqués, est instantanée. Par conséquent, la structure des objets obtenus est sous contrôle cinétique. L'assemblage dans des conditions d'association proches de l'équilibre thermodynamique a fait l'objet de peu d'études et devrait conduire à des objets aux propriétés probablement différentes de celles des objets issus de la voie sous contrôle cinétique. De plus, les résultats de ce travail devraient enrichir la modularité de la technologie de complexation polyélectrolyte, dont le potentiel d'utilisation est déjà important, particulièrement dans le domaine biomédical.

L'objectif premier de notre recherche était de former des particules de tailles colloïdales à partir d'une concentration forte en polymère. Sous contrôle cinétique, l'accroissement de la concentration en polymère lors de l'assemblage conduit à la formation de systèmes massifs. Pour conserver les propriétés colloïdales de l'assemblage, nous avons montré qu'il fallait maîtriser les interactions électrostatiques responsables de l'association. Notre stratégie a consisté à écranter les charges des deux polyélectrolytes en ajoutant au milieu d'association du chlorure de sodium et à éliminer progressivement ce sel par dialyse. L'optimisation de cette méthode, dit de

complexation contrôlée, a nécessité une étude préalable sur l'impact de la concentration en sel sur la solubilité des polysaccharides mis en jeu. Le degré d'acétylation du chitosane est apparu comme un paramètre prépondérant sur la solubilité du chitosane en présence de sel et, par conséquent, sur notre processus de contrôle. Ainsi, nous avons montré qu'à partir d'un *DA* de 39% et au-delà, le chitosane reste soluble en solution aqueuse contenant 2 à 6 mol.L<sup>-1</sup> de chlorure de sodium, concentrations suffisantes pour écranter les interactions électrostatiques ente les deux polyions mis en présence. Pour les *DAs* inférieurs à cette valeur critique, la concentration en sel qui maintient la solvation du chitosane n'assure pas l'écrantage total des charges des polyélectrolytes et donc le contrôle de leur association.

La technique de complexation contrôlée que nous avons mise au point permet d'obtenir de façon reproductible des particules de taille submicroniques en utilisant des concentrations en polymère jusqu'à 30 fois supérieures à celles utilisées conventionnellement. De plus, un point remarquable est la stabilité colloïdale des nano-objets observée à 37°C, en milieu physiologique et au pH gastrique. Enfin la méthodologie permet l'obtention de colloïdes multifonctionnels via l'encapsulation de molécules actives ou la sorption de biomolécules d'adressage. La complexation contrôlée présentée dans ce travail est applicable à divers polyions, même si nous n'avons pas effectué un examen exhaustif de toutes les structures possibles. Enfin, nous avons montré que la méthode d'assemblage dans des conditions proches de l'équilibre peut conduire à des hydrogels massifs, en adaptant la masse molaire du chitosane et le rapport de charge ( $n^+/n^-$ ) entre les deux polyélectrolytes.

Certains points de nos travaux requièrent encore de plus amples investigations. Tout d'abord, nous avons observé une diminution de la taille des particules avec la diminution du seuil de coupure des membranes de dialyse. Si cet effet a été reproduit au cours de plusieurs expériences indépendantes, ce résultat inattendu mais très intéressant reste encore inexpliqué et nécessitera une étude plus systématique. La méthode de complexation contrôlée a été mise au point en utilisant uniquement du chlorure de sodium comme agent d'écrantage des charges des polyélectrolytes. Il serait judicieux d'étudier les effets d'autres sels sur le procédé et les caractéristiques des objets formés. Enfin, ce serait certainement un aspect très riche

## Conclusion générale

---

d'information que de regarder l'évolution de l'organisation de la solution au gel (ou des particules) au cours de la dialyse par diffusion des rayons X aux petits et grands angles.

Pour ce qui concerne l'utilisation des matériaux obtenus par cette technologie, il conviendrait de travailler les points suivants. Les particules formulées par cette technique correspondent à nos exigences de départ en termes de taille, reproductibilité et capacité à fixer des molécules d'adressage, cependant il est nécessaire de poursuivre les investigations sur l'encapsulation de drogues anti VIH-1 et tester leur capacité à cibler les cellules infectées grâce à des IgA adsorbées à l'interface. Concernant l'aspect macrohydrogels, leur évaluation comme scaffold pour l'ingénierie tissulaire pourrait avoir lieu tout d'abord sur des cultures de cellules *in vitro* puis chez l'animal pour évaluer leur biocompatibilité *in vivo*.



ANNEXES.

Techniques expérimentales

---



## I. Détermination du degré d'acétylation du chitosane

La densité de charge du chitosane est donnée par son degré d'acétylation,  $DA$ , qui constitue la fraction d'unité N-acétylée le long de la chaîne polymère. Ce paramètre peut être déterminé par divers techniques : analyse élémentaire<sup>1</sup>, titration potentiométrique ou conductimétrique<sup>2,3</sup>, diffraction des rayons X<sup>4</sup>, spectrométrie IR ou UV<sup>5</sup> et la RMN<sup>6</sup>  $^1H$  ou  $^{13}C$ . La RMN du proton est actuellement la méthode de choix puisqu'elle est plus précise, ne nécessite aucun étalonnage et requiert de faibles quantités de matière. De plus, elle est facile à mettre en œuvre, dès lors que le polymère est soluble dans l'eau deutérée en présence d'acide chlorhydrique.

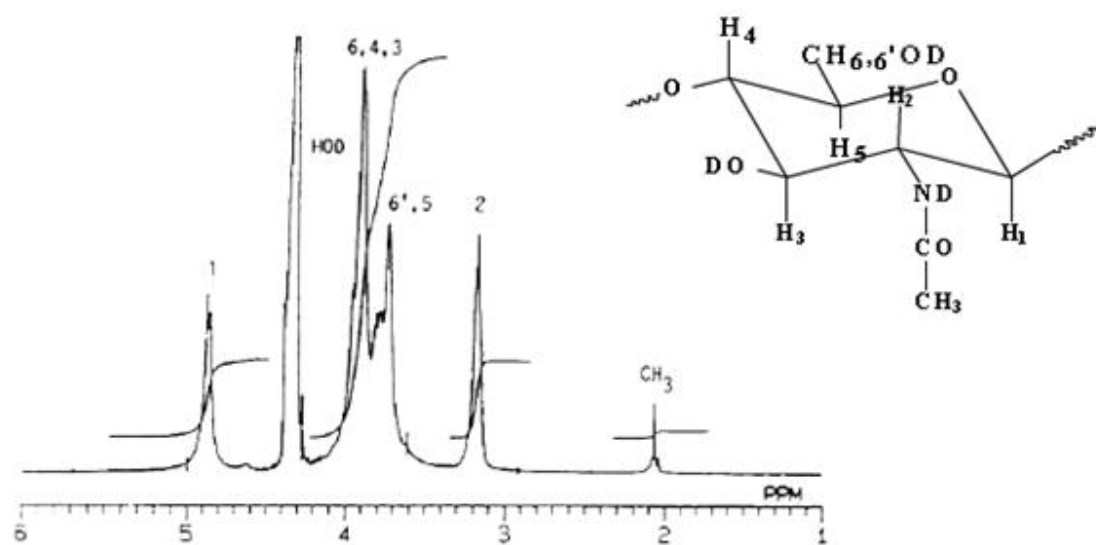
### Protocole expérimental :

*10mg de chitosane est dissoute une nuit, sous agitation, dans un mélange de 1mL d'eau deutérée et 5  $\mu$ L de HCl. Le polymère solubilisé est ensuite mis dans un tube RMN de diamètre 5 mm pour analyse en RMN du proton à 300 K.*

Le calcul du  $DA$  se fait par la méthode de Hirai et al<sup>7</sup> qui consiste à comparer l'intensité de résonance des protons méthyles du groupe acétamide dont le déplacement chimique est de l'ordre de 2 ppm, avec celle des protons du cycles (H2-H6) située entre 3 et 4 ppm (Fig. 19), en ne tenant pas compte du pic de résonance des protons H1, dont l'aire est trop faible. Le  $DA$  est donné par la relation :

$$DA = \left( \frac{\frac{1}{3} I_{CH_3}}{\frac{1}{6} I_{H_2-H_6}} \right) \times 100 \quad (25)$$

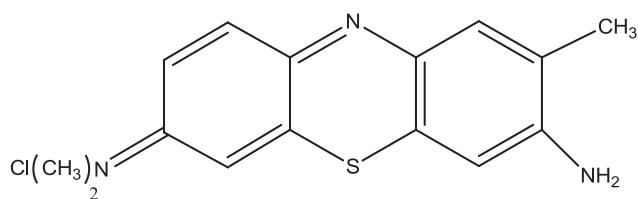




**Figure 19.** Spectre RMN <sup>1</sup>H d'un chitosane à 400 MHz<sup>7</sup>.

## II. Détermination des taux de sulfate du sulfate de dextrane et de l'héparine

La teneur résiduelle en sulfate contenu dans le sulfate de dextrane et l'héparine est déterminée par titration colloïdale à l'aide d'un pigment cationique, le bleu de Toluidine<sup>8,9</sup> (Fig.20). Cette méthode de titration classique est facile à mettre en œuvre et nécessite dans un premier temps le dressage d'une courbe de calibration. Pour cela, une mesure de l'absorbance à 584 nm de différentes concentrations de Toluidine est effectuée. Le mélange d'un volume de polyanion à concentration fixe avec un volume de Bleu de Toluidine induit une complexation spontanée des deux composés. Cette réaction provoque une diminution d'ions toluidine libres et donc une diminution de l'absorbance. L'extrapolation de l'absorbance ainsi mesurée à la droite de calibration donne accès à la teneur en sulfate.



**Figure 20.** Structure chimique du bleu de Toluidine.

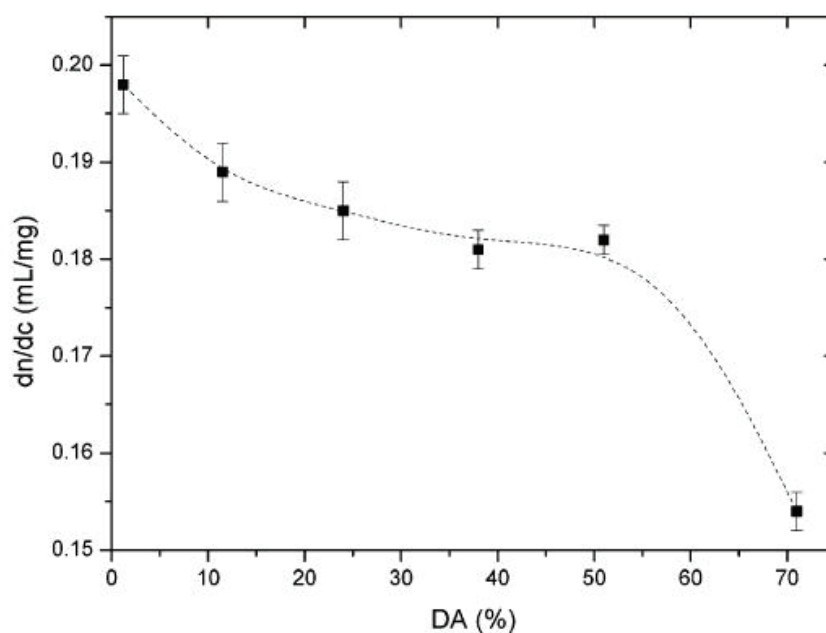


### III. Détermination de la masse molaire et indice de polydispersité des polysaccharides

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à la diffusion de la lumière est la méthode de choix pour déterminer la masse molaire des polymères en solution puisqu'elle permet l'accès aux masses moléculaires et leur distribution<sup>10,11</sup>. C'est cette technique que nous avons utilisée pour la caractérisation des masses molaires moyennes,  $M_w$ , et des indices de polydispersités,  $I_p$ , de nos échantillons.

La caractérisation chromatographique des polyélectrolytes tels que le chitosane est particulièrement délicate à réaliser à cause des effets de charges entre le macroion, l'éluant et la phase stationnaire. Il faut donc se placer dans des conditions adéquates de solvant, pH et force ionique pour éviter les interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire et pour limiter les interactions électrostatiques induites par le polyélectrolyte. L'utilisation du tampon 0,2M acide acétique/0,15M acétate d'ammonium (pH 4,5) comme éluant permet, dans le cas du chitosane de limiter les possibilités de liaisons hydrogène entre le polymère et la phase stationnaire<sup>10-12</sup> et de favoriser l'écrantage des charges du chitosane.

La détermination de la masse moléculaire  $M_w$ , requiert indispensablement la valeur de l'incrément d'indice de réfraction  $dn/dc$  de l'échantillon. Ce paramètre dépend du solvant utilisé, de sa force ionique et du DA. Schatz et al<sup>13</sup> ont établi une loi de variation universelle entre le DA d'un chitosane de distribution statistique et l'incrément d'indice de réfraction dans une tampon 0,2M acide acétique/0,15M acétate d'ammonium (pH 4,5) (Fig. 21). Nous avons utilisé ces valeurs pour déterminer les masses molaires moyennes  $M_w$  de nos échantillons de chitosane.



**Figure 21.** Variation de l'incrément d'indice ( $dn/dc$ ) en fonction du DA, dans un tampon 0,2 M acide acétique/ 0,15 M acétate d'ammonium (pH 4,5)<sup>13</sup>.

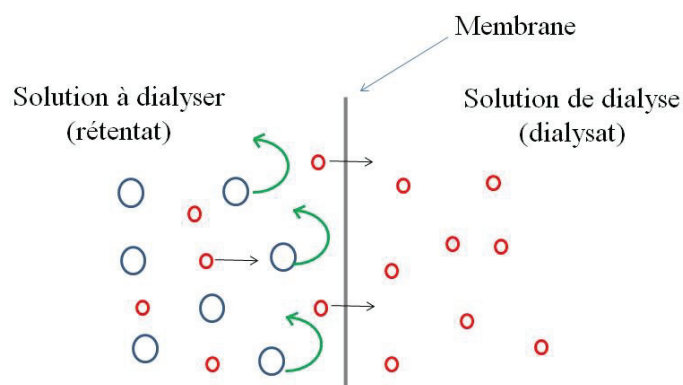
Dans le cas du sulfate de dextrane et de l'héparine, un tampon de nitrate de sodium à 0,1N (pH 7) a été utilisé comme éluant<sup>8</sup>. La valeur de l'incrément d'indice de réfraction des deux polyanions a été évaluée par nos propres soins à l'aide d'un interféromètre différentielle. Les valeurs trouvées sont données dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Valeurs de l'incrément d'indice de réfraction du sulfate de dextrane et de l'héparine dans un tampon de nitrate de sodium à 0.1N

Echantillons	Valeur de l'incrément d'indice de réfraction ( $dn/dc$ ) expérimentale (mL/g)
Sulfate de dextrane	0,100
Héparine	0,117

#### IV. La dialyse

La dialyse est une méthode de séparation de molécules en solution par diffusion à travers une membrane sous l'effet d'une pression osmotique. Cette méthode est contrôlée par le pouvoir de diffusion des molécules mais également leurs gradients de concentration. En effet, chaque molécule diffusible, c'est-à-dire de masse molaire inférieure à la porosité de la membrane, traversent celle-ci selon un gradient de concentration. A l'équilibre, les concentrations en molécules diffusibles seront égales de part et d'autre de la membrane (rétentat et dialysat). Afin d'éliminer complètement les petites molécules contenues dans la solution, il est nécessaire de renouveler le solvant de dialysat.



**Figure 22.** Représentation schématique de la séparation de molécules en solution par dialyse.



## V. Détermination de la taille des particules

La méthode la plus courante pour déterminer le diamètre hydrodynamique moyen des particules est la diffusion quasi-élastique de la lumière (ou spectroscopie de corrélation de photons). La fluctuation dans le temps de l'intensité de diffusion, provoquée par le mouvement brownien des particules est traitée par un corrélateur numérique dans le but d'obtenir la fonction d'autocorrélation  $g(\tau)$  du signal. L'algorithme le plus couramment utilisé pour l'analyse des signaux est la méthode des cumulants dans lequel la fonction d'autocorrélation  $g(\tau)$  est assimilée à une série de puissance :

$$g(\tau) = \exp \left[ -\langle \Gamma \rangle \tau + \left( \frac{\mu_2}{2} \right) \tau^2 - \left( \frac{\mu_3}{3} \right) \tau^3 + \dots \right] \quad (26)$$

$\Gamma$  est le temps de décroissance du signal et  $\tau$  le temps de corrélation.

De ces données, le coefficient de diffusion  $D$  est déduit de la relation :

$$\langle \Gamma \rangle = q^2 D \quad \text{avec} \quad q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad (27)$$

$q$  : vecteur de diffusion

$n$  : indice de réfraction du solvant

$\lambda$  : longueur d'onde de la lumière incidente

$\theta$  : angle de détection. Les mesures ont été effectuées à un angle fixe de  $173^\circ$ .

Ainsi, le diamètre hydrodynamique  $R_h$  est calculé à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (28)$$

Où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue de mesure et  $\eta$  la viscosité du solvant.



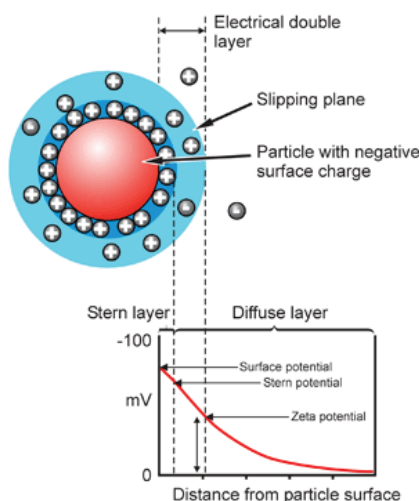
Pour chacun des échantillons, trois séries de dix mesures ont été réalisées.

L'indice de polydispersité, PDI, est déterminé selon l'algorithme :

$$PDI = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle} \quad (29)$$

## VI. Potentiel Zêta

Le potentiel zêta caractérise la charge électrique « effective » à la surface des particules et quantifie leur stabilité. Les particules dotées de charge surfacique nette sont écrantées à l'approche d'une concentration d'ions de charge opposées. Ainsi, ces derniers se déplacent avec les particules. La couche composée de la surface chargée et des ions de charges opposées est appelée double couche électrique (Fig. 23). Le potentiel zeta, noté  $\zeta$ , est donc la mesure de la différence de potentiel entre le solvant dans lequel sont dispersées les particules et la double couche électrique.



**Figure 23.** Représentation schématique de la double couche électrique d'une particule et du potentiel zeta. (Reproduction de Malvern Instruments).

La cellule contenant la dispersion de particule est soumise à un champ électrique pour mettre les objets en mouvement. La vitesse de déplacement des particules est mesurée (effet doppler) par Laser Doppler Velocimetry. La variation de l'intensité de diffusion est traitée par un algorithme de l'appareil pour en extraire les données utiles au calcul du potentiel. En effet, la détermination de la mobilité électrophorétique des particules en suspension (ensemble des mouvements des particules en suspension dans le liquide de dispersion soumis à l'influence d'un champ électrique) permet de quantifier le potentiel zêta par l'équation de Henry :

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (30)$$

$U_E$  représente la mobilité électrophorétique,  $\varepsilon$  la constante diélectrique du solvant,  $\zeta$  le potentiel zeta,  $f(\kappa a)$  la fonction de Henry et  $\eta$  la viscosité du solvant.

Dans la fonction de Henry,  $\kappa^{-1}$  désigne la longueur de Debye, qui est souvent prise comme étant la mesure de "l'épaisseur" de la double couche électrique. Le paramètre " $a$ " définit le rayon de la particule. Le terme " $\kappa a$ " mesure donc le rapport entre le rayon de la particule et l'épaisseur de la double couche électrique (Fig. 23).

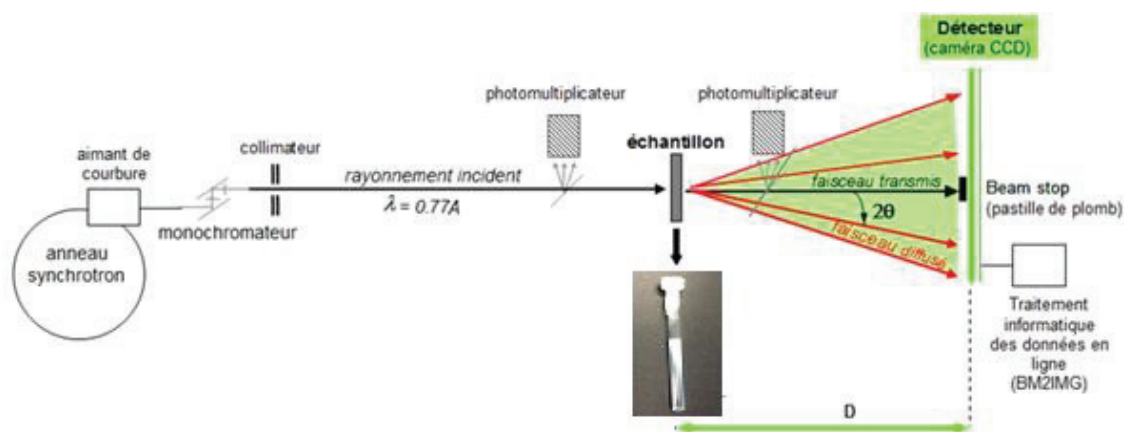
La mesure du potentiel zêta se fait à partir de deux approximations différentes selon la nature du solvant dans lequel sont dispersées les particules. La première approximation dite de Hückel est appliquée dans le cas des particules ayant des tailles de quelques nanomètres. Dans ce cas, la fonction de Henry,  $f(\kappa a)$ , vaut 1. La seconde approximation dite de Smoluchowski est la plus couramment utilisée. Elle est employée lorsque les particules sont dispersées dans l'eau, à des concentrations en sel modérées mais supérieures à  $10^{-3}M$  et ont une taille supérieure à 200 nm. Dans ce cas, la fonction de Henry vaut 1.5. Cette approximation a été utilisée pour toutes nos mesures.

Notons que cette technique est adaptée à l'interprétation des résultats des particules dont les charges se situent exclusivement à l'interface. Dans notre cas, les objets analysés sont constitués de polyélectrolytes fortement hydratés (gonflés d'eau) qui peuvent contenir une fraction de charges dans leur volume. Les charges volumiques peuvent contribuer à la mobilité électrophorétique. Dans ces conditions, le potentiel zêta reflète plutôt un état de charge global des particules et non sa charge interfaciale uniquement.

## VII. Diffusion des rayons X aux petits angles appliquée aux complexes polyelectrolytes

La diffusion des rayons X aux petits angles est une méthode permettant aussi l'étude structurale d'hydrogels ou de particules dans leur milieu de formation, dans une fenêtre de tailles caractéristiques de 10 à 400Å.

Le principe de la technique est présenté sur la figure 24. Un rayonnement X monochromatique est utilisé pour éclairer un échantillon positionné à une certaine distance du détecteur, supérieure à 1 mètre dans le cas du SAXS. L'interaction de l'onde électromagnétique incidente avec les nuages électroniques des atomes de l'échantillon provoque la réémission d'un rayonnement. L'intensité de ces faisceaux diffusés en fonction de l'angle de diffusion  $2\theta$  est collectée par un détecteur.



**Figure 24.** Représentation schématique de la technique de diffusion des rayons X.

La valeur de l'angle de diffraction  $2\theta$  dépend de la longueur d'onde ( $\lambda$ ) du faisceau incident. Pour pouvoir comparer différents échantillons indépendamment de l'énergie de la source utilisée dans les expériences de diffusion, il est indispensable de s'affranchir de la valeur de  $\lambda$ . Les courbes de diffusion sont alors représentées en fonction du vecteur de diffusion par :

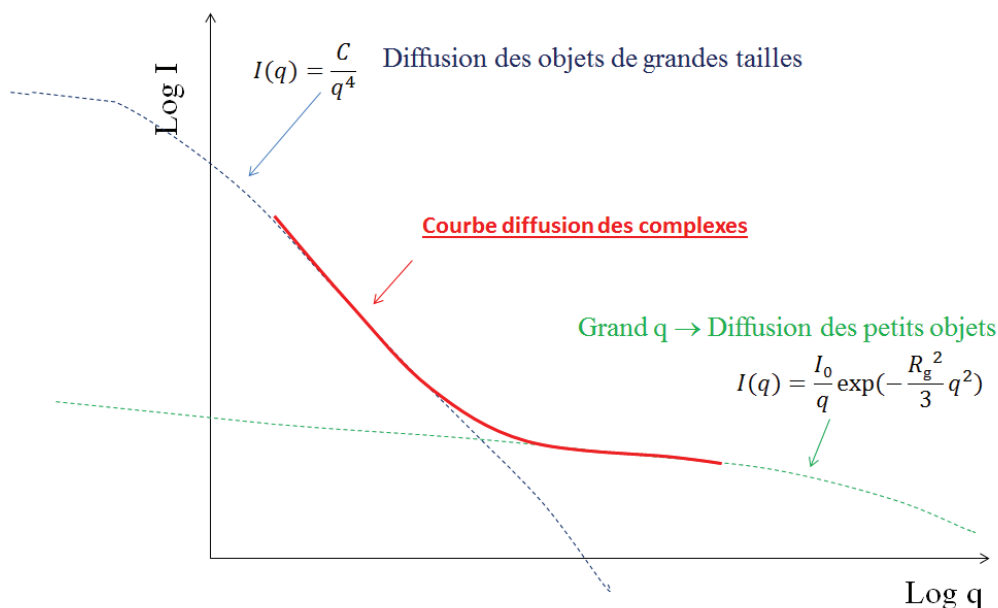
$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (31)$$

$\theta$  représente l'angle d'observation.

Les expériences de diffusion des rayons X aux petits angles menées au cours de ce travail ont été réalisées sur la ligne BM2-D2AM à l'ESRF (Grenoble, France). Une source synchrotron a été utilisée pour obtenir des diagrammes de diffusion sur des échantillons faiblement diffusants, sous formes de solutions ou suspensions de polymères naturels. Nous avons choisi une énergie incidente de 16,000 keV. Les données sont ensuite collectées avec un détecteur bidimensionnel, une camera CCD sensible aux rayons X de Ropper Scientific. Les corrections des mesures tels que la normalisation des données par rapport au temps de pose et au coefficient de transmission de l'échantillon, de l'intensité incidente, l'élimination du bruit de lecture de la caméra, la distorsion du réseau de fibres optiques, et la réponse de la caméra à un éclairage homogène sont réalisées avec le logiciel *bm2img* disponible sur la ligne BM2-D2AM. Ce logiciel effectue également les moyennes azimutales autour du 'centre de gravité' du faisceau incident.

Pour réaliser les analyses, les échantillons (solutions de chitosane, particules ou hydrogels) sont introduits dans des capillaires cylindriques en verre, de diamètre interne 2 mm. L'ensemble est ensuite placé sur un porte-échantillon possédant des trous de placement des tubes, et des trous perpendiculaires pour le passage du faisceau de rayons X, pour procéder aux mesures de diffusion. Pour le traitement des données, il est nécessaire de soustraire la cellule vide, correspondant à un tube plein d'eau.

La figure 24 représente schématiquement l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion  $q=4\pi \sin(\theta)/\lambda$  ( $\theta$  est le demi-angle de diffusion,  $\lambda$  la longueur d'onde incidente) en échelles linéaires pour un système particulier non anisométrique.



**Figure 25.** Représentation schématique des courbes de diffusion  $I(q) = f(q)$  des complexes polyélectrolytes obtenus. Le domaine de la loi de Guinier ( $I = I_0 \exp(-R_g^2/3 q^2)$ ) est visible dans le domaine  $qR_g \ll 1$  ; pour les grandes valeurs de  $q$ , c'est la morphologie de surface qui est révélée par la loi de Porod  $I = C/q^4$  (Cas des interfaces nettes). Dans un régime intermédiaire, les agrégats peuvent être caractérisés par une dimension fractale  $\alpha$ .

Différents régimes de diffusion permettent d'interpréter classiquement la structure des objets analysés.

Dans le cas des complexes polymères polyanion/polycation, nous avons travaillé à des vecteurs de diffusion correspondant au domaine de Porod des particules dont la taille est trop grande pour être déterminée par SAXS. Dans ces conditions, la loi de diffusion peut être une loi généralisée de la forme  $I(q) = C q^{-\alpha}$ . L'exposant  $\alpha$  de la loi généralisée de Porod permet de déterminer les paramètres géométriques de la surface particules diffusantes (rugosité, ou fractalité de la surface).

La représentation log-log de la variation de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde  $q$  est linéaire. Dans ce cas, la valeur de  $\alpha_1$  donnée par la pente de la droite vers les petits  $q$  permet d'interpréter la structure interfaciale des particules:

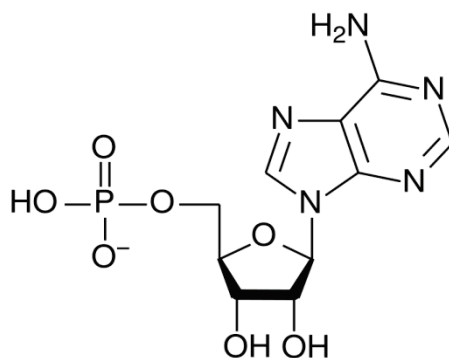
- $\alpha_1 = 4$  : surface particulaire parfaitement lisse
- $3 \leq \alpha_1 \leq 4$  : fractale de surface  $ds=6-\alpha_1$
- $\alpha_1 < 3$  : agrégat de fractale de masse  $dm=\alpha_1$

D'autre part, dans le cas de la loi de Guinier pour des particules anisométriques, l'exposant  $\alpha$  renseigne sur le type d'anisométrie de la particule:

- $\alpha_2 = 0$  : structure de particules non anisométriques (en moyenne sphérique)  
 $I(q)=I_0 \exp(-Rg^2 q^2/3)$
- $\alpha_2 = 2$  : structure en plaquette ou de type disque:  $I(q)=I_0/q^2 \exp(-T^2 q^2/12)$
- $\alpha_2 = 1$  : structure particulaire en bâtonnet :  $I(q)=I_0/q \exp(-R_0^2 q^2/2)$

### VIII. Préparation de l'adénosine monophosphate (AMP)

L'AMP (Fig. 26) est une molécule de structure chimique similaire au Ténofovir, une molécule antirétrovirale. La mise en place de la méthode d'encapsulation s'est faite avec cette molécule dans la perspective de l'adapter à l'encapsulation du Ténofovir. L'AMP a une masse molaire de  $365.24 \text{ g.mol}^{-1}$ , est soluble dans 1M de soude ou d'ammonium. Il absorbe en UV à 260 nm. Avant de procéder à l'encapsulation de l'AMP, il est indispensable d'ajuster son pH à environ 7 pour éviter la précipitation du chitosane. Le balayage en UV à 260 nm d'une solution d'AMP à pH basique (solubilisation dans NaOH) et à pH ajusté à 7-8 montre que le changement de pH n'altère pas la solubilisation de la molécule (Fig. 27).



**Figure 26.** Structure chimique de l'adénosine monophosphate.

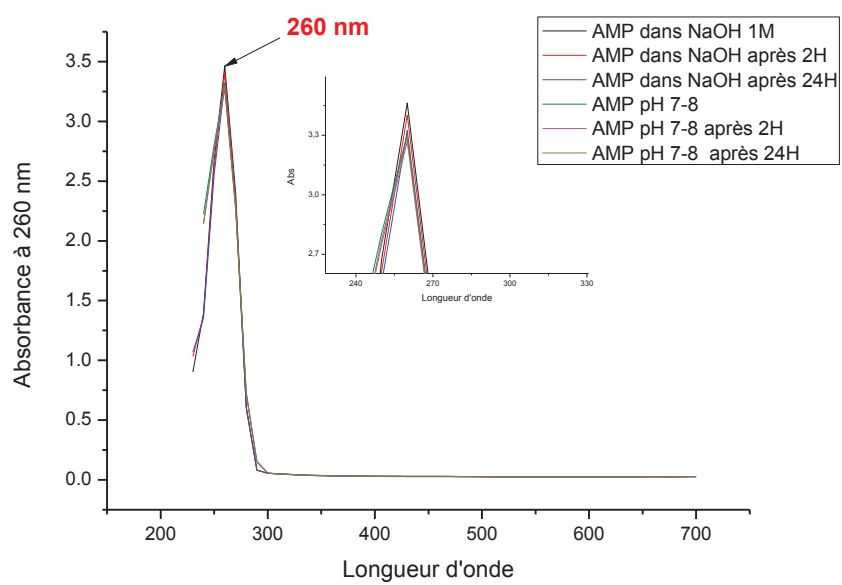
#### Protocole expérimentale :

*Dissolution de l'AMP dans 1M NaOH. La concentration de cette solution 1 est de  $40 \text{ mg.mL}^{-1}$ .*

*La solution 1 est diluée dans 1M NaOH (concentration =  $0.1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et est balayée en UV à 260 nm.*

*Une autre dilution avec une solution d'acide acétique à 1M (concentration finale =  $0.1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) est effectuée. Le pH de celle-ci est ajusté à 7-8 avec une goutte d'acide acétique concentré et est ensuite placée dans une microplaque pour un balayage en UV à 260 nm.*





**Figure 27.** Effet du changement de pH sur la solubilité de l'AMP. Balayage en UV à 260 nm.

## IX. Détermination de la quantité d'AMP encapsulé

Les quantités d'AMP contenu dans les particules chitosane/sulfate de dextrane et chitosane/héparine ont été déterminées selon deux méthodes différentes. La première est la plus couramment utilisée. Elle consiste à doser le surnageant de manière à déterminer la quantité de molécule non encapsulée et déduire par la suite la quantité réellement contenue dans les particules à partir de la concentration d'AMP initialement utilisée.

Au cours de nos travaux, nous avons montré que l'ajout de 2M de NaCl dans une dispersion de complexe entraîne la solubilisation complète des particules (paragraphe II-2 de la deuxième partie). La seconde méthode de détermination de la quantité d'AMP encapsulée est donc basée sur cette spécificité. Les détails du protocole sont les suivants :

### Protocoles expérimentaux :

#### ○ Première méthode : Méthode indirecte (à partir du surnageant)

*Dans un premier temps, les dispersions sont centrifugées une heure à 23 000 g. Le surnageant est ensuite séparé du culot et placé dans des microplaques pour mesurer son absorbance à 260 nm. La valeur ainsi recueillie et reportée à la droite de calibration afin de déterminer la concentration d'AMP. Le taux d'AMP encapsulé est donné par la relation :*

$$\%[AMP]_{\text{encapsulé}} = \left( \frac{[AMP]_{\text{initial}} - [AMP]_{\text{surnageant}}}{[AMP]_{\text{initial}}} \right) \times 100 \quad (32)$$

#### ○ Deuxième méthode : Méthode directe (à partir des particules dissoutes)

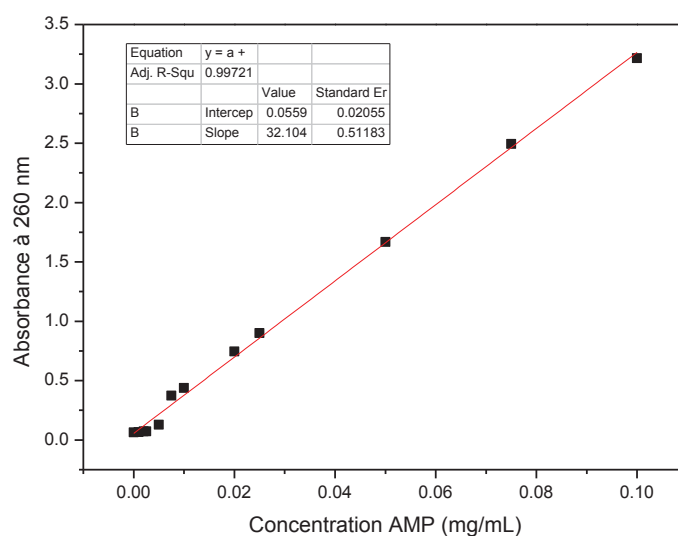
*Comme dans la précédente méthode, les dispersions sont centrifugées une heure à 23 000 g. Le surnageant est ensuite enlevé. Un volume d'eau distillée correspondant à celui du surnageant retiré est ajouté au culot de particules. La pesée de ce dernier faite préalablement permet de déterminer  $D_1$  la dilution effectuée. Une masse de NaCl correspondant à 2M est ajoutée au mélange eau/particule. L'ensemble est ensuite mis sous agitation deux heures. La dissolution complète des particules correspondra à notre solution S1. Un volume  $V$  de S1*

ainsi obtenue est prélevé, dilué 20 fois à l'eau distillée (pour entrer dans la gamme de détection de l'AMP) et placé dans une microplaque pour la détection UV. L'absorbance mesurée est reporté à la droite de calibration (Fig. 9) afin de déterminer la concentration  $C_{Dilution\ 20}$  correspondant à la concentration d'AMP contenue dans la solution de particule diluée 20 fois. Cette concentration est multipliée par 20 et  $D_1$  pour avoir la concentration d'AMP,  $[AMP]_1$ , contenue dans S1. Le taux d'encapsulation est donné par la relation suivante :

$$\%[AMP]_{\text{encapsulé}} = \left( \frac{[AMP]_1}{[AMP]_{\text{initial}}} \right) \times 100 \quad (33)$$

#### ○ Graphe d'étalonnage de l'AMP

Pour établir le graphe de calibration, une solution d'AMP à pH 7-8, préparée selon l'annexe VIII est diluée avec un mélange eau et NaCl à 0.1M afin d'obtenir plusieurs concentrations différentes dont l'absorbance a été détectée à 260 nm.



**Figure 28.** Graphe de calibration de l'AMP

# Références bibliographiques

---



1. Kasaai, M. R., Arul, J. & Charlet, G. Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **38**, 2591–2598 (2000).
2. Crini, G., Badot, P.-M. & Guibal, E. *Chitine et chitosane Du biopolymère à l'application*. 27 (2009).
3. Raymond, L., Morin, F. G. & Marchessault, R. H. Degree of deacetylation titration and solid-state of chitosan using conductometric NMR. *Carbohydr. Res.* **246**, 331–336 (1993).
4. Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R. & Zhang, X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydr. Res.* **340**, 1914–7 (2005).
5. Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J. & Stepnowski, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar. Drugs* **8**, 1567–636 (2010).
6. Lamarque, G., Lucas, J.-M., Viton, C. & Domard, A. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: role of various structural parameters. *Biomacromolecules* **6**, 131–42 (2005).
7. Hirai, A., Odani, H. & Nakajima, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Polym. Bull.* **94**, 87–94 (1991).
8. Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C. & Delair, T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* **5**, 1882–92 (2004).
9. Ueno, K. & Kina, K. Colloid titration-A rapid method for the determination of charged colloid. *J. Chem. Educ* **62**, 627 (1985).
10. Beri, R. G., Walker, J., Reese, E. T. & Rollings, J. E. Characterization of Chitosans Via Coupled Size-Exclusion Chromatography and Multiple-Angle Laser Light- Scattering Technique. *Carbohydr. Res.* 11–26 (1993).

11. Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Roberts, G. & Rinaudo, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer (Guildf)*. 9921–9927 (2001).
12. Ottoy, M. H., Varum, K. M., Christensen, B. E., Anthonsen, M. W. & Smidsrod, O. Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans. *Carbohydr. Polym.* 253–261 (1996).
13. Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C. & Domard, A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules* **4**, 641–8 (2003).

# Valorisation du projet PECSDDDELI

---





Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont fait l'objet de divers publications et communications qui sont les suivantes :

○ Publications dans des revues scientifiques à comité de lecture

- Reversible controlled assembly of chitosan and dextran sulfate: A new method for nanoparticle elaboration. M. Costalat, L. David, T. Delair. Carbohydrate polymers 102, 717-726 (2014).
- Controlling the complexation of polysaccharides into multi-functional colloidal assemblies for nanomedicine. M. Costalat, P. Alcouffe, L. David, T. Delair. Journal of Colloid and Interface Science 430, 147-156 (2014).
- Spontaneous and controlled formation of polyelectrolyte complex macro-hydrogels from chitosan, dextran sulfate or heparin. M. Costalat, P. Alcouffe, L. David, T. Delair. Carbohydrate polymers (à soumettre au journal Carbohydrate polymers en tant que short communication)

○ Communications orales

- "Polysaccharide-based nanomaterials from controlled polyelectrolyte complexation as drug delivery systems", 3rd EPNOE International polysaccharide conference, Nice, 21-24 Octobre 2013. Marie Costalat, Laurent David, Thierry Delair.
- "Chitosane - sulfate de dextrane pour la vectorisation d'antirétroviraux", 1ère Journée Lyonnaise Agents d'imagerie, Lyon 21 février 2013. Marie Costalat, Ramona Polexe, Céline Terrat, Armelle Cuvillier, Gaël Champier, Bernard Verrier, Thierry Delair
- "Élaboration de particules submicroniques par association contrôlée de polysaccharides", 16<sup>ème</sup> Journée du Groupe Lyonnais des Glyco-Sciences (GLGS) Villeurbanne, 15 Novembre 2012. Marie Costalat, Laurent David, Thierry Delair.

- "Colloïdes par association contrôlée de polysaccharides", Colloque GFP Grenoble, 19-22 Novembre 2012. Marie Costalat, Laurent David, Thierry Delair.
- "Élaboration de colloïdes par complexation polyélectrolytique contrôlée de polysaccharides", JEPO 40 Anduze, 2 Octobre 2012. Marie Costalat, Laurent David, Thierry Delair.
- **Communications par affiche**
  - "Chitosan based material from controlled polyelectrolyte complexation", 11th International Conference of the European Chitin Society, EUCHIS, Porto, Portugal, 5-8 Mai 2013, Poster. Marie Costalat, Laurent David, Thierry Delair.